

M.G./J.C. — 1056 bis

UNIVERSITE DE PARIS

Année 1969 - 1970

FACULTE DE PHARMACIE

Série E — N°

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Alain DELCOURT

MODIFICATION DE L'EQUILIBRE THIOL-DISULFURE DANS LA CELLULE VEGETALE

APPLICATION A L'ETUDE DU MECANISME D'ACTION DE LA COLCHICINE

Soutenue le ... 1970

JURY : MM. DEYSSON Président

PIETTE
GUIGNARD Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550207_0001

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. MALANGEAU P.		DOYEN
M. GUILLOT M.	O + ...	Assesseur
M. DELAVEAU P.		Assesseur
M. RODINEAU L.	+	Secrétaire Général
Mme FERRARI S.		Attaché Principal d'Administration Universitaire Adjointe au Secrétaire Général
M. BRENN A.	+	Attaché Principal d'Intendance Univer- sitaire
M. TRICAN J. N.		Attaché Principal d'Administration Universitaire
M. JEANDEL L.		Attaché d'Administration Universitaire
Mme ESPINASSE M. L.		Attaché d'Administration Universitaire
M. JACOB	+	Attaché d'Administration Universitaire
Mme MUR A. M.		Attaché d'Administration Universitaire
Melle FRIZOL E.		Attaché d'Administration Universitaire

DOYEN HONORAIRE

M. VALETTE Guillaume O +

PROFESSEURS HONORAIRES

M. LAUNOY		O +
M. FLEURY P.		O +
M. PICON M.		O +

ADMINISTRATIF

M. DELAUNAY P.	Directeur
M. GILBERT M.	Administrateur
M. DELAUNAY P.	Administrateur
M. BOURGAT J.	Secrétaire Général
M. LEBLANC R.	Secrétaire Principal d'Administration
	Enseignement Supérieur de Médecine
	Chirurgie
M. BERNIER A.	Secrétaire Principal d'Administration
	Chirurgie
M. THIBAUD J. R.	Secrétaire Principal d'Administration
	Chirurgie
M. LEBLANC R.	Secrétaire d'Administration Université
M. BOURGAT J. R.	Secrétaire d'Administration Université
M. JACOB	Secrétaire d'Administration Université
M. JACOB A. M.	Secrétaire d'Administration Université
M. ERICOT E.	Secrétaire d'Administration Université



BOYEN STENOGRAPHIE

M. VALLETTE Isabelle

PROFESSEURS D'ANATOMIE

M. LAURIE	
M. FLAUBERT P.	
M. MOON M.	

PROFESSEURS

M. JANOT M. M.	O + Membre de l'Institut Pharmacie Galénique (T)
M. VALETTE G.	O + ... Pharmacodynamie (T)
M. PARIS R.	O + ... Matière Médicale (T)
M. GUILLOT M.	O + ... Physique (T)
M. GAUTIER J. A.	O + ... Chimie Organique (T)
Melle LAMBIN S.	+ Microbiologie (T)
M. RAOUL Y.	+ Physiologie (T)
M. COURTOIS J.	+ Chimie Biologique (T)
M. DOMANGE L.	O + ... Chimie Générale et Minérale (T)
M. TRUHAUT R.	O + Membre de l'Institut Toxicologie & Hygiène Industrielle (T)
M. MORETTE A.	+ Hydrologie (T)
M. CAVIER R.	+ Parasitologie (T)
M. QUEVAUVILLER A.	+ Hygiène & Education Sanitaire (T)
M. MOREAU R.	+ Pharmacie Chimique (T)
M. GERMAN A.	 Microbiologie (T)
M. PIETTE M.	+ Hématologie (T)
M. MALANGEAU P.	 Chimie Analytique (T)
M. GIRARD M.	+ Biochimie Appliquée (T)
M. DILLEMANN G.	 Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
M. DEYSSON G.	+ Botanique (T)
M. FLAHAUT J.	 Minéralogie (T)
M. RENAULT J.	 Chimie Organique (T)
M. LE HIR A.	 Pharmacie Galénique (T)
M. BOUDENE C.	 Toxicologie & Hygiène Industrielle (T)
M. LARUELLE P.	 Physique (T)
M. ROSSIGNOL P.	 Pharmacodynamie (T)

M. MANGEOT A.		Pharmacie Galénique Industrielle (T)
M. DELAVEAU P.		Séméiologie & Pathologie Générale (T)
M. COHEN Y.		Pharmacodynamie (T)
M. RENAULT H.		Physique
M. BOURDON R.		Chimie Analytique
M. REYNAUD P.		Pharmacie Chimique
M. LE MOAN R.		Toxicologie
M. POISSON J.		Pharmacie Galénique
M. MICHEL R.		Endocrinologie (T)
M. LECLERC M.		Hématologie
M. PÉRCHERON F.		Chimie Biologique
M. SAVEL J.		Biologie Animale
M. DESVIGNES A.		Cryptogamie & Technique Bactériologique

MAITRES DE CONFERENCES

M. PAOLETTI C.		Toxicologie
M. BORY J.		Microbiologie
M. MIOCQUE M.		Chimie Organique
M. GUIGNARD J. L.		Botanique Générale
M. GOUNELLE J. C.		Physiologie
M. BINET P.		Biologie Animale
M. COMBET FARNOUX C.		Chimie Organique
M. PLAT M.		Chimie Analytique
Mme PLAT M.		Législation & Déontologie Pharmaceutique
M. DELACOUX E.		Pharmacie Chimique
M. CAVE A.		Matière Médicale
M. PUISIEUX F.		Pharmacie Galénique

M. DUCHON D'ENGENIERES M.		Chimie Organique
M. ADOLPHE C.		Physique
M. GUERNET M.		Chimie Analytique
M. DIDRY J.		Mathématiques appliquées aux Sciences Expérimentales
M. KHODADAD P.		Chimie Minérale
M. PERLES R.		Chimie Biologique
M. LEMONNIER A.		Biochimie Appliquée
M. YONGER J.		Chimie Analytique
M. HAMON M.		Chimie Analytique
M. MESTRE J.		Botanique
M. AGNERAY J.		Biologie
M. DREUX C.		Biochimie Appliquée
M. RIVET J.		Chimie Générale et Minérale
M. ETIENNE J.		Mathématiques
M. HAZEBROUCQ G.		Physique
M. ROUSSELET F.		Biochimie Appliquée
M. BOURRINET P.		Hygiène
M. SOULEAU Ch.		Chimie Générale et Minérale
Mme HUBERT J. (délég.)		Microbiologie
Melle BOURNIQUE C. (délég)		Botanique

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M. GESTEAU P.	+
M. GUERIN H.	+
Mme HARISPE M.	
Melle LONGUEVALLE S.	
M. HARISPE	+

CHEFS DE TRAVAUX

M. ANDRE Guy	dél.	TP Pharmacie Galénique 2 - 3 A
M. ADAM Yves	tit.	TP Pharmacie Chimique 5è A (Synthèse médicaments)
M. AYMARD Pierre	tit.	ED Physiologie - Histologie
Melle BARNIER Suzanne	dél.	Mathématiques
Melle DENOIS Martine	dél.	TP Botanique 2è A
Melle BERNARD Jacqueline	tit.	TP Bactériologie 5è A - Industrie
M. BESANCON Pierre	stag.	Mathématiques
Mme BLANC Jeanine	tit.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Mme BONALY Jacqueline	dél.	ED Botanique 1 A
Mme BOSIO A. Marie	dél.	TP Chimie Qualitative
M. BOURLIOUX Pierre	dél.	CES Bactériologie
M. BOY Pierre	dél.	Mathématiques
M. CAILLARD Claude	dél.	TP Pharmacodynamie 4 - 5 A
M. CANAL Jacques	dél.	E.D. et TP 5è A Biologie Officine
M. CARRE Daniel	dél.	Mathématiques
Melle CARRERE Clotilde	tit.	TP Microbiologie 4 A
M. CEOLIN René	dél.	ED Chimie Minérale 1 A
Mme CENAC Jacqueline	tit.	CES Parasitologie
Mme CHARDENOT Paulette	tit.	Chimie Biologique 3 - 4 A
Mme CHARPENTIER Madeleine	tit.	ED Chimie Générale & Minérale 1 A
M. CHERON Jean-Marie	dél.	TP Chimie Biologique 3 - 4 A
Melle CLAIR Geneviève	tit.	ED Matière Médicale 3 - 5 A
M. DAGRON Christian	tit.	ED Chimie Générale & Minérale 2 A
M. DAVY Jean	dél.	CES Biochimie
Melle DECAUDIN M. Thérèse	tit.	TP Parasitologie 4 A
M. DELATTRE Jacques	dél.	ED et TP CES Electro-Chimie et 5è A. Biologie
M. DELCOURT Alain	dél.	ED Botanique 2 A
M. DOUSSIN Alexandre	tit.	TP Chimie Analytique 5 A
Melle DUCHENE Dominique	dél.	CES Pharmacie Galénique Industrielle

Melle DUMANT Geneviève	tit.	CES Analyse physico-chimique des médicaments
Mme DUPONT Charlotte	tit.	CES Pharmacodynamie
M. ETIENNE Guy	tit.	TP Pharmacie Galénique 2 - 3 A
Mme FAURE Liliane	stag.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Melle FLEURY Solange	tit.	ED Chimie Analytique Quantitative
Melle FOGLIETTI M. José	tit.	TP Chimie Biologique 3 - 4 A
M. GAIRARD Alexis	dél.	CES Contrôle médicaments (biologie)
M. GAYRAL Philippe	dél.	TP Zoologie 1 A
Melle GERMAN François	dél.	Mathématiques
M. GIRARDEAU J. François	dél.	TP Chimie Organique 5 A (Synthèse Organique)
M. GOBERT Jean	stag.	TP Zoologie 1 A
Melle GOURSAT M. José	tit.	ED Botanique 1 A
M. GROSSIORD J. Louis	dél.	TP Physique 1 A
Melle GUILLOUX Edith	dél.	TP Chimie Biologie 3 - 4 A
M. HENRY Jacques	tit.	Essais médicaments chimiques et galéniques
Mme JULIEN Maud	tit.	ED Physique 2 A
M. JULIEN René	tit.	ED Chimie Minérale 1 A
Melle JUND Yvonne	tit.	CES Microbiologie et contrôle médicaments. Microbiologie
M. LALEGERIE Pierre	stag.	CES Biochimie
M. LAROCHE Jacques	tit.	TP 5 A - Secourisme - Hygiène Education Sanitaire
Mme LEDUC Yvette	tit.	TP Chimie Analytique Qualitative
M. LEGENDRE Lucien	dél.	TP Chimie Organique 2 A
Mme LEGER Nicole	tit.	Parasitologie 5 A
M. LELUC Robert	tit.	CES Bactériologie
M. LEMAY René	tit.	CES Législation
M. LEPAREUR Christian	dél.	Mathématiques
Mme LE QUANG THUAN	stag.	TP Chimie Analytique Qualitative
M. LEVILLAIN Pierre	tit.	ED Chimie Analytique Qualitative
Mme LEVY Françoise	dél.	ED Botanique 2 A

M. LIKFORMAN Joseph	tit.	ED Physique 1 A
Melle LONGEVIALLE Monique	tit.	ED Botanique 1 A
M. MAHUZIER Georges	tit.	TP Chimie Analytique Quantitative
M. MANDEREAU Jean	tit.	CES Pharmacotechnie Chimique
M. MANET Léon	stag.	CES Biochimie
M. MARTIN-FRERE Henri	tit.	TP Chimie Générale & Minérale 1 A
M. MAUGUEN Yves	dél.	Mathématiques
Mme MAYRARGUE Joëlle	dél.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Melle MICHELET Annick	tit.	ED Chimie Générale & Minérale 2 A
M. MOULIN Pierre	dél.	TP Physique 1 A
Mme MOURY Jacqueline	stag.	TP Zoologie 1 A
Mme NOTTEGHEM M. Jacqueline	tit.	ED Parasitologie 4 A
M. NGUYER Phu Lich	dél.	CES Toxicologie
Mme PANOUSE Jacquelin	tit.	CES Microbiologie - Virologie Immunologie
Mme PAOLAGGI Françoise	stag.	ED et TP CES Electro-Chimie et 5è A Biologie
M. PESTIS Jean	tit.	TP Anatomie, Physiologie Humaine
Mme PIETTE Colette	tit.	CES Hématologie 5 A - Biologie
M. POULLAIN Pierre	tit.	CES Hématologie 5 A - Biologie
M. POUSSET J. Louis	tit.	TP Chimie Extractive 5 A
M. QUENEZ Pierre	tit.	TP Chimie Générale & Minérale 1 A
Mme RABIANI Odile	dél.	ED Chimie Analytique Qualitative
M. RABARON Alain	dél.	CES Pharmacotechnie Galénique
Mme ROBERT Monique	tit.	CES Immunologie - Microbiologie
M. RODIER Noël	dél.	ED Physique 2 A
Melle ROLLEN Alice	tit.	TP Botanique 1 A
Melle ROUSSELET Renée	tit.	Essais médicaments végétaux
Mme RUDLER Michèle	dél.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Mme SALES Nicole	stag.	TP Physiologie, Histologie
Melle SEBASTIEN Francine	dél.	TP Microbiologie 5 A (Biologie Officine)
M. SCHUSTER Jean	tit.	Essais des médicaments chimiques et galéniques

Melle SORIA Claudine	stag.	ED et TP 5è A Biologie Officine
Mme SEILLER Monique	tit.	TP Pharmacie Galénique Industrielle
Melle STRUPLER Nicole	tit.	ED Chimie Générale & Minérale 1 A
M. TOUBOUL J. Pierre	dél.	TP Chimie Analytique 5è A
M. TRIEU Thuang Cong	tit.	TP Chimie Analytique Quantitative
Melle TROUPEL Solange	stag.	TP Chimie Analytique Quantitative
Mme VAN AMERONGEN Geneviève	dél.	ED Chimie Analytique Quantitative
M. VAYSSIERE J. Michel	dél.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
M. VILLERS Jacques	tit.	TP Physique 2 A
Mme WELBY Josette	dél.	TP Pharmacie Galénique

BIBLIOTHEQUE

Melle RUYSSSEN	+	Conservateur en Chef
Mme DESGRIPPES A.		Conservateur
Mme COULET M.A.		Conservateur
Melle LANGLOIS C.		Conservateur
N ...		Conservateur

(+ Chevalier
 Légion d'Honneur) O Officier
 (C Commandeur

MODIFICATION DE L'EQUILIBRE THIOL-DISULFURE
DANS LA CELLULE VEGETALE

APPLICATION A L'ETUDE DU MECANISME
D'ACTION DE LA COLCHICINE

A mes parents,

A ma femme,

A la mémoire de Monsieur le Professeur CRETE,
qui m'a nommé assistant.

A Monsieur le Professeur DEYSSON, qui a bien voulu m'intégrer à son équipe et à qui je dois beaucoup, en témoignage de ma respectueuse gratitude et de mon profond dévouement.

A Monsieur le Professeur PIETTE, qui m'a fait l'honneur de faire partie du Jury de cette thèse, en témoignage de ma respectueuse reconnaissance.

A Monsieur GUIGNARD, Maître de Conférences, auprès de qui j'ai toujours trouvé beaucoup de bienveillance, en témoignage de ma profonde gratitude.

A Monsieur MESTRE, Maître de Conférences, en souvenir de nos études communes et pour les bons conseils qu'il m'a toujours prodigués, en témoignage de ma sincère reconnaissance.

A Mademoiselle DELAGE, dont l'assistance technique m'a été précieuse, en témoignage de ma vive reconnaissance.

A mes Collègues et à mes Amis, en témoignage de ma gratitude.

ABREVIATIONS UTILISEES

NEM	: N-éthylmaléimide
POH	: Hydroxyde diphénylmercure
ME	: β -mercaptoéthanol
DTE	: Dithioérythritol
DTDG	: Dithiodiglycol
AN	: 6-Aminonicotinamide
AP	: Acétylpyridine
Col	: Colchicine

INTRODUCTION

Le fuseau, indispensable aux mouvements ordonnés des chromosomes et à leur répartition en 2 lots strictement équivalents, est mis en place au début de la mitose et disparaît lorsque celle-ci est terminée.

En raison de son existence transitoire, il impose à la cellule des remaniements moléculaires réversibles sur lesquels nous commençons à être bien renseignés grâce à la mise au point des techniques d'isolement de l'appareil mitotique (ensemble des éléments chromatiques et achromatiques) qui ont fait considérablement progresser la science de l'appareil fusorial.

Achromatique et fibreux, le fuseau est constitué de subunités microtubulaires protéiques liées par des liaisons - S - S -, ce qui implique l'oxydation préalable de - SH au moment de sa formation.

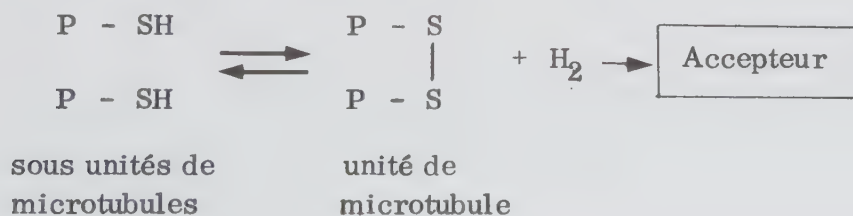
Une de ses caractéristiques, essentielle pour le biologiste, réside dans sa grande sensibilité à la moindre variation du milieu cellulaire environnant.

Il y a en effet un grand nombre de substances qui, dès qu'elles ont pénétré dans la cellule, sont capables d'inhiber l'assemblage des microtubules ou de détruire le fuseau. Ce sont les "mitoclasiques" dont la colchicine est le chef de file.

Le mécanisme d'action de l'alcaloïde a fait l'objet d'hypothèses variées, parmi lesquelles nous retiendrons celle de DEYSSON (51 a, b, c) qui pense à un blocage spécifique d'une chaîne de transporteurs d'hydrogène.

Ainsi, le point de départ de notre expérimentation est double : intervention de groupements - SH dans la polymérisation des microtubules et activité antidéshydrogénasique de la colchicine.

Une conception relativement simple de l'édification fusoriale émerge de l'ensemble de ces résultats : union de subunités sulfhydrylées par un mécanisme d'oxydoréduction impliquant l'apparition de ponts disulfures avec libération d'hydrogène capté par les transporteurs.



Il nous a paru intéressant d'étudier les perturbations fusoriales provoquées par un déséquilibre du rapport thiol-disulfure. Dans cette intention, nous avons empêché le déroulement normal de cette réaction en bloquant les groupements - SH par le N - éthylmaléimide et l'hydroxyde de phenylmercure ; en apportant un excès de groupements thiols avec le mercaptoéthanol et le dithioérythritol ; en provoquant une surcharge en liaisons disulfures par administration de dithiodiglycol ; enfin, en agissant au niveau des transporteurs d'hydrogène avec le 6 - aminonicotinamide, l'acétylpyridine, la galactoflavine.

Ces produits ont été systématiquement associés ou opposés à la colchicine car, dans la mesure où ils modifient l'effet mitoclasique de cette substance en l'annulant ou en l'augmentant, il nous a paru possible de définir les relations existantes entre l'alcaloïde et la réaction d'oxydo-réduction thiol-disulfure et de soumettre à un contrôle expérimental l'hypothèse formulée par DEYSSON (51 a, b, c,).

Puisque notre travail entre dans le cadre de problèmes actuellement en pleine évolution, il nous a semblé nécessaire de présenter d'abord une mise au point sur les données récentes relatives à la morphologie, à la physico-chimie et à la biochimie du fuseau, et relatives au mécanisme d'action de la colchicine.

Ensuite, nous aborderons l'exposé de notre expérimentation : protocole opératoire et résultats.

Dans la dernière partie, nous essaierons de dégager les faits les plus significatifs que nous ont apportés nos recherches et nous serons conduit à conclure à la validité de l'hypothèse de DEYSSON.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

SUR LE FUSEAU

I - MORPHOLOGIE

A - LE FUSEAU EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Il y a une quarantaine d'années, plusieurs chercheurs, travaillant avec un microscope ordinaire, signalèrent déjà la présence de fibres fusoriales.

Ultérieurement, l'amélioration des techniques d'observation de la cellule vivante ou fixée contribua à la connaissance de plus en plus précise de l'appareil fusorial.

L'examen *in vivo* de cellules d'albumen en microscopie à contraste de phase (7, 10) prouva l'existence d'une "zone claire", périnucléaire ou bipolaire, fortement biréfringente, vide d'inclusions cytoplasmiques, qui participe à l'élaboration du fuseau en même temps que le nucléoplasme.

Au microscope polarisant, la "zone claire", les fibres continues, les fibres chromosomiques et interzonales sont biréfringentes. Cette similitude suggère que des structures différentes pourraient être formées de la même substance (80). Dès sa formation, le fuseau serait un système en équilibre, composé de micelles orientées baignant dans des micelles de même nature mais non orientées (80). La fluctuation de la biréfringence pendant la mitose et pendant la cytotélière traduirait l'assemblage et la disjonction des mêmes unités micellaires (81).

Enfin, la microscopie interférentielle (3) révèle une augmentation de la masse sèche par unité de surface de zone fusoriale jusqu'à la formation de la "zone claire", bientôt suivie d'une diminution de cette même masse sèche au moment du plein développement de cette "zone". Il apparaît ainsi que la réorientation de particules micellaires ne peut, à elle seule, rendre compte de l'apparition de la structure fibreuse et qu'elle est vraisemblablement accompagnée soit d'une sécrétion soit d'une synthèse de matériel.

A l'heure actuelle, on s'accorde à reconnaître 4 groupes de fibres fusoriales :

- les fibres "pôle-pôle", continues, reliant les pôles ou les centrosomes,
- les fibres "astériennes", rayonnant autour des centrosomes, constantes chez les animaux, pouvant exister aussi mais de manière fugace chez les végétaux ainsi que l'a démontré DIETRICH (52) à l'aide de la microradiographie par contact,

- les fibres "pôle-cinétochore" ou fibres chromosomiques, tendues entre le cinétochore et les centrosomes,
- les fibres "interzonales" qui constituent le fuseau cytokinèse et qui n'apparaissent qu'au moment de l'ascension polaire des chromosomes (52).

B - LE FUSEAU EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

La microscopie électronique a non seulement confirmé la structure fibreuse du fuseau mais a conduit à la notion de "microtubules", dont l'origine, l'organisation et le comportement au cours de la mitose commencent à être bien connus.

1) - La notion de "microtubules" : structure fine et distribution.

Les premiers travaux relatifs à l'ultrastructure du fuseau (197) décrivaient les fibres fusoriales comme des éléments filamenteux. Mais aujourd'hui leur nature tubulaire est bien établie et est admise par tous (8, 75, 101). Une récente observation de REBHUN et SANDER (152) montre que ce sont les microtubules qui sont responsables de la biréfringence.

Un microtubule est une structure rectiligne ou légèrement incurvée, mesurant environ $\text{\AA}$ de diamètre, qui montre, en coupe longitudinale, 2 parois sombres délimitant une lumière claire.

Divers auteurs se sont attachés à déterminer la constitution des microtubules (197), et c'est grâce à une technique de dispersion du matériel sur interface air-eau suivie d'une coloration négative (94) que les microtubules fusoriaux ont été résolus en 13 fibrilles ou protofilaments, eux-mêmes composés d'un alignement de particules globulaires de $40 \text{ \AA}$ environ enroulées en spirale (100).

Les microtubules sont impliqués dans une grande variété d'infrastructures cellulaires et de fonctions tant dans la cellule animale que dans la cellule végétale (101, 140, 148, 174). Bien que leur rôle proprement dit soit encore incertain, ils semblent intervenir dans le maintien du squelette cellulaire, dans certains mouvements cytoplasmiques en raison de leur contractilité et dans le transport de métabolites (145).

Il est important de souligner qu'un rapprochement intéressant a été fait (147) entre les filaments tubulaires des fibres fusoriales d'une part et les filaments des cils et des flagelles d'autre part. Ces éléments prennent naissance à partir d'organites similaires : les centrioles et les corpuscules basaux. C'est pourquoi certains auteurs se sont adressés indifféremment aux microtubules fusoriaux, ciliaires ou flagellaires pour en effectuer l'étude chimique ou physico-chimique ou pour connaître l'action pharmacologique d'une substance à leur niveau.

Cependant, actuellement, il semble que cette identité ne soit plus aussi rigoureuse qu'on l'avait d'abord supposé (14, 187).

2) - Origine des microtubules fusoriaux

Chez la cellule animale, les fibres fusoriales convergent vers le centriole et plus exactement vers les corps péricentriolaires et certains auteurs (182) pensent que cet organite est en fait le centre producteur de microtubules dont l'ensemble constitue les fibres continues. Chez la cellule végétale, apparemment dépourvue de centriole, les microtubules joignent néanmoins l'un et l'autre pôle (144).

En outre, divers auteurs (32, 138) estiment que des profils de réticulum endoplasmique "smooth" participent à la formation des microtubules. Cette hypothèse est basée sur le fait que de nombreux fragments de réticulum, apparus avant la mitose, sont encore visibles lorsque les microtubules se rassemblent au pôle.

Enfin, de nombreuses photographies montrent que certains microtubules fusoriaux sont localisés en une région bien déterminée du chromosome, le cinétochore, et que plusieurs microtubules peuvent être réunis à un seul cinétochore (154). HARRIS et BAJER (75) et BAJER (96) travaillant sur des cellules d'albumen d'Haemanthus, définissent une fibre chromosomique comme un faisceau de 50 à 150 microtubules reliés au cinétochore.

Ainsi, le cinétochore sert bien de point de fixation des microtubules, mais, de plus, de nombreux faits accréditent l'idée qu'il est également le site à partir duquel se développent les éléments tubulaires des fibres chromosomiques (81, 138, 159, 182). Cependant, certains pensent que le cinétochore n'a effectivement qu'un rôle de fixation et que ce sont les rayons astériens qui sont les véritables centres producteurs des fibres "pôle - cinétochore" (197).

ANDRE et BERNHARD (4) montrent que l'aboutissement au pôle d'une fibre chromosomique émanant d'un cinétochore a lieu, en fait, au niveau des corps péricentriolaires et non au niveau du centriole. Chaque tubule est réuni au corps péricentriolaire par des ponts.

3) - Comportement des microtubules au cours de la mitose

Le comportement des microtubules au cours de la mitose est maintenant bien connu grâce aux travaux de PICKETT - HEAPS et NORTHCOTE (144), de LEDBETTER (100), de BURGESS et NORTHCOTE (32), de BAJER (9a), de DEYSSON et BENBADIS (49, 50).

Dans les noyaux quiescents, les microtubules sont localisés dans les couches périphériques du cytoplasme et sont disposés de telle façon qu'ils semblent étroitement correspondre à l'orientation des microfibrilles de cellulose.

Avant la prophase, une bande de microtubules apparait dans le cytoplasme, vient se placer perpendiculairement à l'axe du futur fuseau et encerclent le noyau.

Pendant la prophase, les microtubules migrent et se disposent parallèlement à l'axe du fuseau. Ils s'amassent aux pôles fusoriaux. Cette disposition correspond à la "zone claire" de BAJER (49). En fin de prophase, la structure fusoriale typique est élaborée.

A la métaphase, les fibres continues et chromosomiques convergent vers les pôles près desquels sont situés de nombreux profils de réticulum endoplasmique probablement dérivés de l'enveloppe nucléaire.

A l'anaphase, le fuseau s'accroît en longueur. Les microtubules sont enchevêtrés aux pôles. Le centre de la figure mitotique, pauvre en fibres, contient beaucoup de ribosomes. Pendant ce temps, quelques dictyosomes se rassemblent à l'équateur de la cellule.

A la télophase, le phragmoplaste se forme, d'origine golgienne vraisemblablement. Les fibres interzonales sont denses et leur orientation est identique à celle de la bande microtubulaire préprophasique, ce qui indiquerait que, dès la prophase, l'emplacement du futur phragmoplaste est déjà déterminé à partir des bords de la cellule. Puis les microtubules, lorsque la cytodiérèse est achevée, gagnent la périphérie cellulaire (50).

II - PHYSICO-CHIMIE

Parallèlement aux données morphologiques, l'étude physico chimique de l'appareil mitotique a fait de rapides progrès à partir du moment où il a été possible de l'isoler.

A - LES TECHNIQUES D'ISOLEMENT DE L'APPAREIL MITOTIQUE

Ces techniques se déroulent en 3 temps :

- Stabilisation de l'appareil mitotique avec dispersion concomitante du cytoplasme
- Dissolution du matériel stabilisé
- Caractérisation des composants.

Depuis la méthode originale de MAZIA et DAN (130) qui consistait à solubiliser sélectivement les membranes et le contenu cytoplasmiques dans un détergent, le Duponol, après action stabilisatrice d'un peroxyde, les procédés de manipulation de l'appareil mitotique se sont nettement améliorés puisqu'il est maintenant possible de l'isoler directement à partir des cellules vivantes. Apparaissent successivement les techniques à l'alcool-digitonine (123), au dithiodiglycol (132), à l'héxylène glycol complété par des variations de pH (86), au dithiodipropanol (161).

Les milieux de dissolution sont le thioglycolate à pH très alcalin (130), le salyrgan et le PCMB (201), le chlorure de potassium à 0,60 M (86) ou 0,53 M (161), l'acide chlorhydrique à pH = 3 (18).

L'ultracentrifugation différentielle, l'électrophorèse, l'immunochimie sont les méthodes les plus couramment utilisées pour caractériser les composants de l'appareil mitotique.

Naturellement, chacune de ces méthodes a ses avantages et ses inconvénients (127, 197). D'une manière très générale, on peut dire que la méthode au Duponol n'est plus employée, que la technique à l'alcool-digitonine donne des résultats inconstants, que les procédés au dithiodiglycol et à l'héxylène glycol, beaucoup moins drastiques, procurent une excellente stabilisation et s'appliquent aux cellules vivantes. De plus le traitement par l'héxylène glycol à pH = 6,4 s'accompagne de la dissolution de plus de la moitié des protéines de l'appareil mitotique dans une solution de KCl 0,6 M, alors que le milieu au dithiodipropanol à pH = 6,0 - 6,2 favorise la dissolution rapide d'environ 70 % du matériel (129) dans une solution de KCl 0,53 M à pH = 8,5.

La diversité des milieux d'extraction aussi bien que des milieux de dissolution impose la plus grande prudence dans l'interprétation des résultats car il est évident que des réarrangements moléculaires se produisent au cours de la stabilisation et que la solubilité du matériel qui en résulte varie d'un solvant à l'autre. Asini, il semble que la méthode à l'hexylène-glycol extrait beaucoup plus de lipides que la méthode au dithidiglycol.

B - LA RESOLUTION DES MICROTUBULES EN UNITES ET SUBUNITES

L'appareil mitotique isolé par la méthode à la digitonine et dissous dans le salyrgan (201) montre une composition protéique relativement simple. En effet, deux composés seulement sont identifiés : l'un, majeur, sédimentant en ultracentrifugation différentielle à 8,6 S, l'autre, mineur, à 3,7 S. Après 24 à 36 heures de dialyse en milieu ajusté à pH = 8,5 - 9,5 par un mélange véronal - HCl, ou à pH = 7,5 - 8,0 par un tampon phosphate, un seul composant subsiste, qui sédimente à 3,2 S. L'électrophorégramme révèle que le composant 8,6 S représente 90 % des protéines de l'appareil mitotique contre 10 % seulement pour le composant 3,7 S.

Les asters d'oeufs parthénogénétiques d'oursins traités par la technique au dithiodiglycol renferment 2 composants majeurs dont les constantes de sédimentation sont 14 S et 21 S et 2 composants mineurs (56).

Trois fractions protéiques sont caractérisées dans les solutions d'appareil mitotique dans le K Cl 0,53 M à pH = 8,5 après stabilisation par le dithiodipropanol (161) : la plus importante sédimente à 3,5 S et les deux autres à 11 - 13 S et 22 S. Une fois purifié par précipitation quantitative par des sels de calcium et redissolution dans l'EDTA, le composant 3,5 S peut être scindé par le dithiothreitol ou le sulfite de sodium en 2 sous-unités 2,5 S. La scission de ce composant par le dithiothreitol s'accompagne de la récupération de 2 - SH libres supplémentaires, ce qui indique que l'unité 3,5 S est en fait un dimère dont les monomères sont liés entre eux par une liaison disulfure. Le calcul des poids moléculaires donne 68.700 pour le composant 3,5 S et 34.700 pour la sous-fraction 2,5 S. Quant à la protéine 13 S, elle représente probablement un polymère de 2,5 S.

La validité de ces résultats est confirmée par l'analyse d'appareils mitotiques isolés, cette fois, par la méthode à la digitonine. SAKAI (162) et MIKI - NOUMURA (135, 136) concluent également à la présence d'une structure fibrillaire, extraite par l'héxylène-glycol, composée d'éléments de 40 Å environ, sédimentant en majorité à 2,3 S. Cette fraction 2,3 S se montre homogène en électrophorèse.

De son côté, KANE (87) signale que l'appareil mitotique d'oeuf d'oursin, stabilisé par l'héxylène glycol et dissous dans K Cl, contient deux fractions protéiques : la moins importante sédimente à 4 - 5 S et la plus abondante à 22 S. Cette dernière fraction représente environ 8 % des protéines totales du matériel dissous et est également présente dans les oeufs non fécondés. KANE pense que cette protéine fait partie intégrante de l'appareil mitotique ou, au moins, qu'elle est étroitement associée à la structure fibreuse.

Ultérieurement, BIBRING et BAXANDALL (18), employant la technique de KANE mais substituant au K Cl un milieu acide à pH = 3 qui solubilise sélectivement les microtubules de l'appareil mitotique et des doublets externes des flagelles de spermatozoïdes, confirme la présence de la protéine 22 S au moyen d'une méthode immunochimique.

STEPHENS (178) définit les caractéristiques physicochimiques de cette fraction dans l'intention de la relier aux fractions obtenues par les autres méthodes.

Son poids moléculaire est estimé à 880.000. Elle n'est liée ni à des nucléotides ni à des lipides et n'a pas d'activité A T Pasique. Elle est de forme globulaire et mesure 150 à 200 Å de diamètre, mais, en milieu moyennement acide et en présence de magnésium, elle forme des fibres de 40 à 60 Å de diamètre.

Sa composition en acides aminés se révèle constante chez 3 espèces d'oursin et se caractérise par une teneur élevée en acide glutamique et aspartique.

Soumise à des pH inférieurs à 4 ou supérieurs à 11 ou traitée par l'urée 2 M ou par le chlorhydrate de guanidine 5 M, elle se décompose en sous-fractions 5-6 S, 6-7 S, 9-10 S, 13-14 S qui se réduisent en 2 sous-unités seulement, 2,5 - 3 S et 4 S, après action d'une solution d'urée 8 M additionnée de 2 % de mercaptoéthanol. D'après les poids moléculaires, évalués à 650.000 environ pour 13 - 14 S, à 240.000 pour 6 - 7 S et 120.000 pour 2,5 - 3 S, on peut envisager que les fractions 6 - 7 S et 9 - 10 S, 13 - 14 S et 22 S sont respectivement les dimère, tétramère, hexamère de 2,5 - 3 S. A pH = 7, toutes ces sous-fractions reconstituent la protéine 22 S, sauf si on les traite par le mercaptoéthanol. Il semble donc que la polymérisation nécessite la création de ponts disulfures. Mais, lorsque la protéine 22 S est reconstituée, elle devient insensible aux réactifs des thiols, ce qui suggère que les liaisons - S - S - sont alors inaccessibles ou bien ne sont qu'accessoires dans le maintien de la structure de la protéine.

Enfin, une protéine 6 S, capable de fixer la colchicine, a été extraite de microtubules d'origine diverse : oeufs d'oursin fécondés ou non (206) ; paire centrale et doublets externes de flagelles de spermatozoïdes d'oursin (171) ; axonème de cellules nerveuses (1) ; doublets externes de cils de *Tetrahymena* (153). Cette fraction a un poids moléculaire de 110 à 120.000 qui, par action du chlorhydrate de guanidine et du mercaptoéthanol, s'abaisse à 55.000. Ce serait donc, en fait, un dimère. Elle est homogène en électrophorèse et apparaît formée de 2 subunités de 40 Å de diamètre en microscopie électronique (172).

La discordance des résultats et la multiplicité des sous-unités peuvent avoir leur origine dans l'absence de standardisation des conditions opératoires. Avec les données existantes, on ne peut pas rejeter catégoriquement l'hypothèse que les fractions 13 S, 8,6 S, 13-14 S correspondent bien à des sous-unités de 22 S. Mais il apparaît alors contradictoire que les unités les plus petites n'aient pas le même poids moléculaire. Cependant, les protéines 2,5 S ou 3,5 S de SAKAI (161) et 2,3 S de MIKI - NOUMURA (135 - 136) ainsi que la sous-unité de la protéine 6 S mesurent toutes 40 Å. Elles sont toutes insolubles dans des solutions de calcium, liées à des nucléotides, et, apparemment, leur composition en acides aminés est voisine de celle de l'actine, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par MAZIA (128) pour la protéine isolée de l'appareil mitotique.

Par contre, aucune de ces propriétés ne caractérise la protéine 22 S (178).

Une étude immunochimique récente de BIBRING et BAXANDALL (19) apporte des renseignements capitaux sur cette protéine.

C - IMMUNOCHIMIE DU FUSEAU .

Les recherches immuno-chimiques ont été entreprises dans une double intention : - d'une part pour savoir s'il y a ou non synthèse de substance au moment de l'édification du fuseau et - d'autre part pour établir des rapports éventuels entre les unités protéiques caractérisées par les techniques physico-chimiques et les constituants fusoriaux.

D'après les résultats obtenus par divers auteurs (197), le fuseau et les asters ont même composition antigénique et au moins 4 antigènes ont été reconnus. L'un d'eux, le composé précurseur 1, largement distribué dans le cytoplasme, compte pour 50 % dans les protéines totales de l'appareil mitotique mais on ignore encore sa relation exacte avec le fuseau. Il n'existe vraisemblablement pas d'antigène spécifique du fuseau. Dans ces conditions, celui-ci serait édifié par un réarrangement de molécules préformées, c'est-à-dire présente dans l'oeuf non fécondé. D'ailleurs, la fragilité du fuseau et sa reconstitution rapide après sa destruction suggèrent à INOUE et SATO (81) que les sous-unités fusoriales ont été synthétisées préalablement à la destruction puisque la reconstruction du fuseau n'est pas entravée par les inhibiteurs de la synthèse protéique.

Les rapports entre le fuseau et la protéine 22 S ont été précisés par BIBRING et BAXANDALL (19).

La détection immuno-chimique de cette protéine donne les résultats suivants : présence dans l'appareil mitotique d'oeufs d'oursin mais absence dans les flagelles de spermatozoïdes d'oursin. En outre, lorsque les oeufs sont traités par la méthode de SAKAI (161), la protéine 22 S n'est pas entraînée dans la fraction Ca-insoluble redissoute dans l'EDTA. D'ailleurs, KANE (87) n'avait pas non plus réussi à l'identifier dans des solutions d'appareils mitotiques extraits par l'alcool - digitonine et dissous dans le salyrgan.

La protéine 22 S se distingue donc immuno-chimiquement de la fraction 3, 5 S de SAKAI et ne paraît pas être une protéine microtubulaire quel que soit le procédé d'extraction utilisé.

Selon BIBRING et BAXANDALL, elle figure dans la constitution de la partie amorphe, plus ou moins vésiculaire, de l'appareil mitotique (74).

D - RELATION ENTRE LA STRUCTURE FINE ET LES SUBUNITES PROTEIQUES .

D'une part, la microscopie électronique a permis d'aboutir à la résolution d'un microtubule en 13 protofilaments formés par un arrangement linéaire de particules de 40 Å de diamètre (94). D'autre part, les résultats physico-chimiques concourent à la mise en évidence de fractions protéiques de constante de sédimentation très proche qui mesurent environ 40 Å. Il n'est pas douteux que ces particules soient bien des subunités microtubulaires puisque le résidu de dissolution de l'appareil mitotique ne contient plus de microtubules mais seulement la partie vésiculaire.

Mais les unités visualisées appartiennent-elles au type dimère ou au type monomère ? La question n'est pas encore résolue définitivement. Cependant, MAZIA (129) et SAKAI (162) pensent qu'à la particule 2, 5 S correspond une dimension de 40 Å.

E - CRISTALLISATION DE LA PROTEINE MICROTUBULAIRE.

Un traitement par la vinblastine, alcaloïde de la Pervenche, entraîne la cristallisation de la protéine des microtubules (15). Ainsi, l'apparition de cristaux mesurant jusqu'à 8 mm a été constatée dans des fibroblastes et des leucocytes (16). Ces cristaux augmentent en taille et en fréquence selon le temps d'exposition à l'alcaloïde ; leur formation n'est pas empêchée par la colchicine, mais elle est retardée par la puromycine.

MARANTZ, VENTILLA et SHELANSKI (118) montrent que la vinblastine provoque la précipitation quantitative d'une protéine identifiée à la protéine microtubulaire et obtenue à partir de surnageants résultant de l'ultracentrifugation des homogénats des cellules HeLa, de cerveau de porc ou de lapin (17).

III - BIOCHIMIE DU FUSEAU : LES PROTEINES SULFHYDRYLEES.

ZIMMERMAN (201) évalue à 6 % la teneur en A R N de l'appareil mitotique, A R N associé probablement à des composés sulphydrylés (76). Le rôle de l'A R N fusorial est encore obscur. Il pourrait constituer un réservoir énergétique indispensable aux mouvements chromosomiques ou avoir une fonction de "reconnaissance", et non pas de synthèse, permettant l'assemblage des protéines unitaires en un fuseau fonctionnel.

On note encore la présence de polysaccharides, de lipoprotéines, d'une A T Pase (197), mais les constituants essentiels du fuseau sont les protéines à groupement thiol.

A - LES THIOLS CELLULAIRES.

Il y a plusieurs catégories de substances sulphydrylées liées directement à la mitose.

- Les thiols catalytiques, c'est-à-dire les groupements - SH dont la présence obligatoire confère une activité enzymatique à une protéine, comme par exemple la triose phosphate deshydrogénase. Etant donné que bon nombre de ces enzymes servent de catalyseurs pour les réactions du métabolisme respiratoire génératrices d'A T P , les problèmes relatifs à la source énergétique indispensable à la mitose et au rôle de l'A T P se trouvent ainsi posés (128, 180). D'importantes monographies sont consacrées à ce type de composés (12, 21) d'après lesquelles on distingue les thiols "free", immédiatement sensibles à leurs réactifs, les thiols "sluggish", beaucoup moins accessibles, et les thiols "masked", qui ne réagissent qu'après dénaturation de la protéine.

- Les thiols structuraux, plus ou moins modifiés au cours de la mitose et présents à 3 niveaux différents dans la cellule.

Dans les chromosomes, la richesse en - SH des protéines a été démontrée par ERNST et HAGEN (60) SHIMAMBURA et Coll. (173), HYDE et PALIWAL (78).

Dans la membrane cellulaire de Candida albicans, une enzyme, la "protéine disulfide reductase", a été identifiée par NICKERSON et FALCONE (141). L'activité élevée de cette enzyme chez les levures rondes qui se divisent fréquemment laisse supposer que des liaisons - S - S - doivent se rompre au moment où les cellules-filles se détachent l'une de l'autre, ce qui est confirmé par le fait que chez les levures filamenteuses, qui ne se divisent que très peu, l'activité enzymatique est très faible.

Enfin le fuseau se révèle être une structure dans laquelle les substances sulphydrylées jouent un rôle prépondérant.

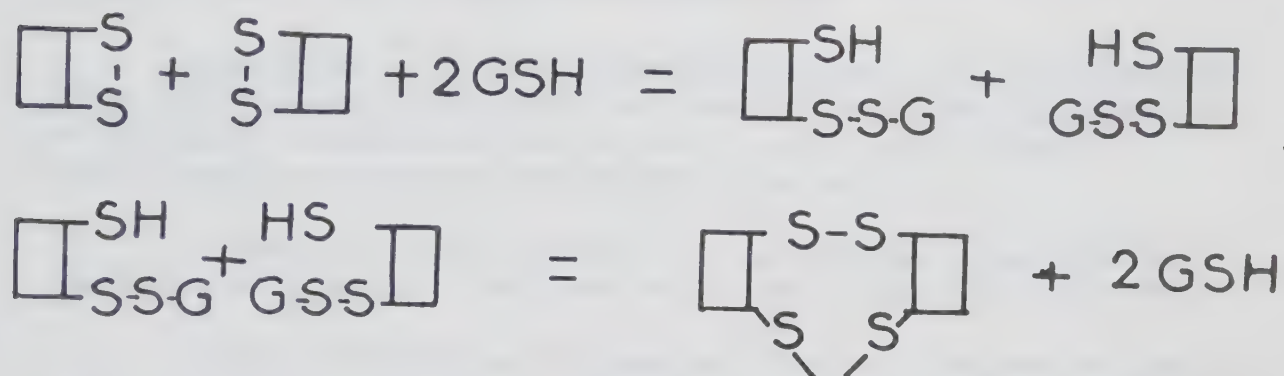
En raison de la très vaste distribution des protéines soufrées et de la diversité de leurs fonctions, il n'est pas étonnant que les recherches concernant leur rôle se soient orientées dans plusieurs directions. Rien que pour la cellule en mitose, furent envisagées la variation des thiols au cours de la division (151), la participation des thiols protéiques à l'édification du fuseau (127, 128), l'interférence de composés soufrés avec la division cellulaire (57, 97, 124).

B - LES THIOLS PROTEIQUES SOLUBLES.

Dès 1931, RAPKINE (151) observa un cycle des thiols acidosolubles au cours de la 1ère mitose de segmentation de l'oeuf d'oursin. La teneur en ces composés diminuait puis augmentait lorsque le fuseau était en voie de formation. Cette variation fut interprétée comme étant le résultat d'une conversion de liaisons disulfures intra-moléculaires en liaisons intermoléculaires. Ainsi, au cours de la mitose, il y aurait un équilibre d'oxydoréduction entre des protéines sulfurées et un composé soufré acidosoluble que RAPKINE assimilait au glutathion.

Dès lors, la "théorie sulfhydrylée de la mitose" suscita de très nombreux travaux et hypothèses.

L'éventualité d'une réaction d'oxydoréduction thiol-disulfure qui servirait à la polymérisation de protéines microtubulaires en un appareil fusorial cohérent fut discutée par MAZIA (122, 126, 127). Celui-ci émet l'idée que le phénomène de gélification du fuseau peut raisonnablement s'expliquer par le passage de liaisons - S - S - de l'état intra- à l'état intermoléculaire. Il suit, en cela, le mécanisme imaginé par HUGGINS et coll. (77) et JENSEN (82) selon lequel un composé sulfhydrylé catalyse la réaction d'échange thiol-disulfure, et il donne le schéma suivant :



Le thiol initiateur, le glutathion, subit donc une variation cyclique compensée par la variation inverse d'une protéine sulfurée. Ce schéma s'applique bien à la gélification mais non à l'orientation des micelles fusoriales.

En somme, une teneur élevée en - SH acidosolubles serait nécessaire au déroulement de la mitose et à l'élaboration du fuseau.

Cependant, il ne semble pas que les thiols acidosolubles soient aussi spécifiques que le pensait RAPKINE. En effet, SAKAI et DAN (163) ont prouvé que le composé sulfhydrylé qui subit les variations cycliques n'est pas le glutathion mais une protéine ou un polypeptide plus grand.

Chez les microspores de Lilium et Trillium, STERN (179, 180) identifie néanmoins le glutathion. Il trouve que sa teneur s'élève avant la division, résultat probable d'une synthèse interphasique, mais rien ne dit que le glutathion réduit provienne du glutathion oxydé après réaction avec une protéine sulfhydrylée. De plus, une seule augmentation de la teneur en glutathion dans les cellules-mères des microspores couvre les besoins de la méiose et de la mitose. Le fait que cette augmentation soit unique et ne soit pas accompagnée d'augmentations secondaires signifie sûrement qu'elle n'est pas une condition impérative de la mitose. STERN pense que le glutathion influence certaines voies métaboliques mais aucun effet bénéfique sur la glycolyse n'a été mis en évidence.

Certes, le rôle joué par les thiols solubles et en particulier par le glutathion est loin d'être élucidé. On sait seulement qu'un abaissement de la concentration en - SH induit par le N-éthyl maléimide pendant la phase prémitotique retarde l'entrée en mitose qui ne s'effectue qu'après que la teneur en thiol soit redevenue normale (180).

C - LES THIOLS PROTEIQUES INSOLUBLES.

L'importance des thiols protéiques insolubles fut démontrée de 3 façons différentes : - par des techniques cytochimiques, - par l'étude de composés capables de rompre les - S - S, et - directement par extraction.

KAWAMURA et DAN (93), étudiant cytochimiquement le comportement des groupements thiols de la zone fusoriale au cours de la 1ère mitose de segmentation de l'oeuf d'oursin, enregistrent une élévation des thiols avant la métaphase à laquelle succède une diminution lors des stades ultérieurs.

SHIMAMURA, OTA et HISHIDA (173) montrent que les intensités des colorations des thiols et des disulfures sont inverses à chaque stade de la mitose.

ALOV et ASPIZ (2) suivent également l'évolution du rapport thiol-disulfure pendant la métaphase, l'anaphase et la télophase chez des cellules amniotiques humaines. Leurs photographies montrent nettement que les fibres fusoriales métaphasiques et anaphasiques donnent une réaction colorée intense pour les disulfures.

Les effets du mercaptoéthanol (125) sur les oeufs d'oursin suggèrent que des thiols protéiques sont impliqués dans l'édification de l'appareil fusorial. Si le mercaptoéthanol est administré avant la métaphase, il y a blocage du fuseau. S'il est administré après la métaphase, la division n'est pas altérée et le blocage ne surviendra qu'au cours de la division suivante.

Une protéine K Cl-soluble (161, 162) est extraite du résidu insoluble dans l'eau d'un homogénat d'oeuf d'oursin. Cette protéine, localisée dans l'enveloppe de l'oeuf, acquiert une structure fibreuse dans certaines conditions et se contracte alors sous l'effet d'ions 2^+ , 3^+ , 4^+ ou d'oxydants neutralisés respectivement par l'EDTA et les réducteurs, mais ne subit aucune modification de la part d'agents alcoylants ou d'agents formant des mercaptides. SAKAI (161, 162) déduit que c'est l'oxydation des - SH qui provoque la contraction de la structure fibreuse. Une relation entre le nombre de - SH présents dans la protéine et le degré de contractilité a été d'ailleurs mise en évidence.

Il est intéressant de noter que la contractilité de cette fraction protéique évolue en même temps que les étapes de la mitose se succèdent. Le maximum de contractilité se situe à la métaphase ce qui revient à dire qu'à ce moment les groupes - SH sont oxydés en - S - S -. L'étirement ultérieur résulte de la transformation des - S - S - en - SH.

En d'autres termes, la variation des - SH de la protéine de SAKAI concorde tout à fait avec l'évolution des thiols au cours de la mitose rapportée par RAPKINE. Cependant, il est important de souligner que la teneur totale de l'oeuf en - SH ne change pas. Donc un second composé soufré subit des altérations inverses de façon à maintenir ce taux constant.

Cette seconde fraction, Ca-insoluble, peut être extraite de la partie hydro-soluble d'un homogénat d'oeuf d'oursin et elle subit effectivement une variation inverse de celle de la protéine contractile.

SAKAI, poussant plus loin ses investigations, définit les conditions dans lesquelles ces protéines entrent dans une réaction d'échange thiol - disulfure du type :



La protéine Ca-insoluble, isolée sous forme d'une particule sédimentant à 3,5 S, fut décomposée en 2 sous-unités 2,5 S (161) et considérée comme le précurseur possible des microtubules de l'appareil mitotique (162). En plus, SAKAI a montré que la réaction thiol-disulfure pouvait se produire in vitro entre les particules 3,5 S et 2,5 S et la protéine contractile du cortex de l'oeuf.

D - LE "PARADOXE DES THIOLS" .

Ainsi un grand nombre d'éléments indiquent que l'assemblage des sous-unités fusoriales dépend bien de la création de ponts - S - S -. Mais il existe un "paradoxe des thiols" (129) qui provient de ce que "les expériences entreprises pour étudier le rôle des liaisons - S - S - dans la structure de l'appareil mitotique donne généralement des résultats positifs" (129), alors qu'il est également exact que celles qui sont entreprises pour déterminer la part que prennent les liaisons faibles, type "hydrogène", donnent aussi des résultats positifs.

Le "paradoxe des thiols" est singulièrement renforcé par tout un ensemble de faits expérimentaux.

En effet, l'instabilité notoire du fuseau est en contradiction avec le fait que c'est une structure dont le maintien nécessite des liaisons covalentes ; cette fragilité conduit à envisager l'intervention de liaisons d'un type différent, labiles : les liaisons "hydrogène".

La dépolymérisation et la polymérisation des fibres fusoriales, phénomènes qui, sous l'influence des basses et hautes températures, s'accompagnent d'une variation de la biréfringence, suggèrent que la stabilité du fuseau en tant que structure orientée dépend de liaisons faibles (79).

La "gélation" du fuseau, probablement consécutive à l'élévation de la viscosité du cytoplasme, et qui est responsable de l'inhibition de la croissance et de la division, s'obtient par administration d'eau lourde. L'effet de l'isotope s'exercerait au niveau des liaisons "hydrogène" et se traduirait par un renforcement de ces liaisons (11, 121).

L'effet des hautes pressions hydrostatiques (202, 203) qui détruisent la structure orientée du fuseau et altèrent le gel intracellulaire est également attribué à une action au niveau des liaisons "hydrogène".

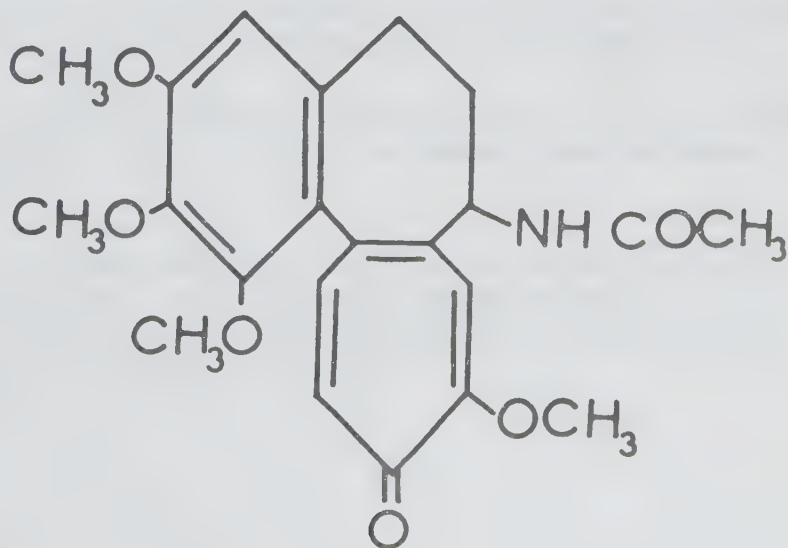
En résumé, on conçoit actuellement le fuseau comme une structure orientée, composée de fibres qui sont édifiées à partir de particules globulaires liées par des ponts - S - S -. La cohérence du fuseau est également assurée par des liaisons "hydrogène". L'ensemble fibreux baigne dans un gel non structuré, vésiculaire, contenant quelques ribosomes libres mais dépourvu de gros organites tels que les mitochondries.

IV - LABILITE : ACTION DE LA COLCHICINE

Les facteurs physiques, chimiques et énergétiques qui déterminent la création d'un état d'équilibre réversible et la polymérisation de macro-molécules font de l'appareil fusorial une structure naturellement instable et fragile.

Le fuseau perd son organisation ou ne l'acquiert jamais lorsqu'un de ces facteurs est modifié ou supprimé sous l'influence de substances dites "mitoclasiques".

A ce propos, il est remarquable de constater que c'est un des composés dont le mécanisme d'action est encore hypothétique qui exerce l'effet le plus spécifique la colchicine, objet d'une importante mise au point d'EIGSTI et DUSTIN (58) complétée par DEYSSON (48).



A - EFFET CYTOLOGIQUE DE LA COLCHICINE.

Dès que furent connus les effets tout-à-fait particuliers de cet alcaloïde, ils suscitèrent de nombreux travaux intéressant différents types cellulaires.

Le trouble caractéristique provoqué par la colchicine consiste en une mitose bloquée, dénommée "stathmocinèse", au cours de laquelle les chromosomes prennent un aspect dit "en tenailles" et ne peuvent pas se réunir en plaque équatoriale en raison de l'absence de fuseau. Ils se répartissent "au hasard, généralement à la surface d'une zone plus ou moins sphérique qui correspond à la substance fusoriale transformée et qu'on appelle pseudo-fuseau" (46). A cette stathmométaphase, plus longue que la métaphase normale, succède une stathmoanaphase "caractérisée par la séparation totale des chromosomes-fils qui restent disposés parallèlement, au voisinage l'un de l'autre (aspect dit "en paires de ski") (46). A la stathmotélophase, le noyau de reconstitution, tétraploïde, prend une forme très irrégulière et peut de nouveau entrer en mitose. Chez les cellules végétales, la répétition de la stathmocinèse aboutit à une polyploïdie élevée. Chez les cellules animales, il n'y a rien de semblable car elles ne supportent pas un long blocage en métaphase.

L'action ménagée de la colchicine peut aussi se traduire par une destruction partielle des fibres fusoriales normalement orientées d'où résultent des images en "étoile" et par des troubles de la translation des chromosomes d'où résultent des mitoses pluripolaires ou hémicinèses.

La cinématographie en contraste de phase (137) révèle que, chez des cellules d'albumen soumises à l'action de la colchicine, la durée de la métaphase anormale est prolongée de moitié par rapport à la durée de la métaphase de cellules saines, et que la "zone claire" annonçant la formation du fuseau se manifeste après la disparition de la membrane nucléaire et non avant. Parfois même, la "zone claire" n'apparaît pas du tout.

L'effet de l'alcaloïde ne porte pas uniquement sur les fibres fusoriales, il s'exerce aussi au niveau des chromosomes.

L'aspect "en tenailles" des chromosomes stathmométaphasiques provient d'une agglutination localisée au niveau du cinétochore (104) alors que les chromatides se séparent normalement, bien que leur enveloppe externe soit altérée (52).

Il semble que l'intégrité cellulaire doive être respectée pour que l'effet colchicinique puisse s'exprimer (165). En effet, les fuseaux isolés deviennent insensibles à l'alcaloïde.

Puisqu'il est maintenant bien établi que les microtubules participent à l'édification de l'appareil fusorial, quelques auteurs se sont attachés à étudier l'action de la colchicine sur les ultrastructures et, plus spécialement, à déterminer la sensibilité des microtubules à l'agent mitoclasique.

ROBBINS et GONATAS (154) ne trouvent plus de microtubules dans les cellules Hela traitées, mais BENHKE (13) observe une désorganisation fusoriale sans disparition de ces éléments dans des cellules de vertébrés.

PICKETT - HEAPS (143), examinant des cellules méristématiques de racines de blé traitées par la colchicine, ne peut mettre en évidence des microtubules à aucun des stades de la stathmocinèse ni au moment de la cytodiérèse.

Ainsi, la disparition des microtubules sous l'effet de la colchicine est reliée directement à la désorganisation fusoriale.

B - ETUDES BIOCHIMIQUES SUR L'ACTION DE LA COLCHICINE.

Les faits expérimentaux relatifs au mécanisme d'action biochimique de la colchicine sont nombreux et entretiennent une grande confusion. Cependant, de récents développements contribuent d'une manière capitale à la compréhension du sort de la colchicine dans la cellule et de son mode d'action.

a - Le sort de la colchicine dans la cellule

L'idée qu'une interaction entre la colchicine et des protéines serait responsable de l'effet mitoclasique a été émise par RYBAK (160). Puis, DEYSSON (44), ne pouvant récupérer la colchicine à partir d'un extrait de germinations de pois préalablement traitées, soupçonna la possibilité d'une transformation ou d'une fixation de l'alcaloïde sur un récepteur particulier.

Il a fallu attendre une quinzaine d'années pour que ces notions de fixation et de récepteur soient confirmées.

En utilisant des embryons de sauterelle colchicinés, WILSON et FRIEDKIN (198) observent la combinaison d'une large fraction de l'agent mitoclasique avec une substance de poids moléculaire élevé, appelée espèce A. Ils concluent que le complexe alcaloïde - espèce A doit représenter un aspect du mécanisme d'action de la colchicine puisque la lumicolchicine, isomère de la colchicine, cytologiquement inactive, ne réagit pas avec l'espèce A. A ce propos, il est intéressant de noter que le podophyllotoxine, elle-même mitoclasique, inhibe fortement la formation du complexe colchicine - espèce A.

En même temps, mais indépendamment, TAYLOR et ses collaborateurs entreprennent une série d'expériences décisives.

BORISY et TAYLOR (20 a, b) établissent que la colchicine tritiée administrée à des cellules KB, à des oeufs d'oursin fécondés ou non, à des cellules nerveuses, se combine à un constituant macromoléculaire soluble, recueilli dans le surnageant issu de la centrifugation d'un homogénat cellulaire. Ce constituant qui est obtenu à partir des flagelles de spermatozoïdes d'oursin par SHELANSKI et TAYLOR (171) est identifié à une sous-unité de microtubule : c'est la protéine 6 S. Ultérieurement, ADELMAN et coll. (1) montrent que les microtubules ciliaires, flagellaires et fusoriaux sont composés d'unités protéiques qui sédimentent à 6 S et qui ont un seul site de fixation pour la colchicine et deux sites de fixation pour GTP.

L'hypothèse la plus plausible qui découle de ces expériences s'exprime ainsi : la fixation de la colchicine sur une subunité microtubulaire empêche la formation d'un microtubule entier. En effet, sous l'influence de l'alcaloïde, les neurofilaments ne s'assemblent pas en neurotubules (199), les myotubes ne s'associent plus (192), la régénération ciliaire chez les Tetrahymena préalablement déciliés est inhibée bien que la synthèse de l'A R N ou des protéines ne soit pas affectée (156, 157).

Il est intéressant de souligner que divers effecteurs physiques ou chimiques peuvent influencer sur la combinaison colchicine - macromolécule, soit en l'inhibant, soit, au contraire, en la favorisant (37). Les acides glutamique, aspartique, fumarique et le tryptophane n'ont pas d'effet. En revanche, la chaleur facilite la dissociation du complexe. La vinblastine non seulement inhibe la destruction mais favorise l'association colchicine - protéine qui est empêchée par la griséofulvine. Ce dernier phénomène, ne fait, en fin de compte, qu'étayer l'hypothèse de Deysson (47), déduite de la synergie colchicine - griséofulvine, selon laquelle le mécanisme d'action de la colchicine diffère de celui de la griséofulvine.

Récemment, MARSLAND (119), et MARSLAND et HECHT (120) signalent que la température et l'eau lourde modifient l'effet mitoclasique de la colchicine soit en l'augmentant soit en l'atténuant.

b - Hypothèses concernant le mécanisme d'action.

Plusieurs groupes d'hypothèses ont été avancés mais aucun n'était vraiment satisfaisant (48).

On a d'abord envisagé une interférence de la colchicine avec les acides nucléiques (48). En 1964, CREASEY et MARKIW (38) enregistrent une diminution de l'utilisation de l'uridine pour la synthèse de l'A. R. N. de transfert mais pas pour celle de l'A. R. N. ribosomal.

GUSTAFFSSON (72) observe un blocage de la synthèse de l'A D N chez des plérocercos de D1 phyllobothrium dendriticum.

L'effet colchicinique a aussi été attribué à un défaut de transport de radicaux monocarbonés. LUKETIC et coll (109) montrent une diminution du taux d'acide folique chez la souris, le chien et l'homme, après administration de la colchicine.

Chez les racines d'Allium (34), un traitement par la colchicine entraîne une augmentation de la synthèse des protéines, de l'A D N et de l'A R N , avec une diminution de l'A T P . Relier l'action mitoclasique de l'alcaloïde à une chute de l'A T P serait possible d'autant plus que SAWADA et REBHUN (166) montrent l'altération de la biréfringence du fuseau sous l'effet d'agents de découplage des phosphorylations oxydatives, mais, à l'heure actuelle, rien ne permet d'étayer ce point de vue.

En même temps, on note une décroissance des thiols avec une croissance corrélative des -S-S-. Ce phénomène est interprété comme une interférence de la colchicine avec les structures primaire, secondaire et tertiaire d'une protéine fusoriale.

La possibilité d'une oxydation des thiols par la colchicine in vitro vient d'être avancée par SEGALA et de PIETRANTONY (169).

A l'heure actuelle, l'hypothèse la plus séduisante concerne l'intervention possible de la colchicine dans un processus d'oxydo-réduction.

L'activité déshydrogénasique du foie de souris régresse après administration de colchicine (139).

En 1965, DEYSSON et DELAGE (51 a-b-c) eurent l'idée d'opposer l'alcaloïde non pas à un produit défini qui ne ferait qu'augmenter la liste déjà longue des antagonistes de la colchicine mais à un produit naturel de composition complexe : l'extrait aqueux de levure de bière qui renferme de l'A R N , des acides aminés (cystéine, arginine, acide glutamique), un tripeptide, le glutathion, des vitamines du groupe B (thiamine, riboflavine, amide nicotinique, chlorhydrate de pyridoxine, pantothénate de calcium, biotine) etc...

Ayant constaté, au préalable, la protection totale exercée par "l'eau de levure" contre les effets de la colchicine, ils entreprirent l'étude fractionnée et systématique du complexe naturel.

L'A R N s'est révélé inactif ainsi que la cystéine, l'arginine, le glutathion. L'acide glutamique n'a qu'un effet antagoniste très discret. En revanche, les vitamines du groupe B exercent une protection comparable à celle de "l'eau de levure". De proche en proche il fut établi qu'en fin de compte le mélange amide

nicotinique - riboflavine suffisait à neutraliser l'action stathmocinétisante de la colchicine, S'appuyant sur le fait que ces vitamines entrent dans la constitution de coenzymes transporteurs d'hydrogène, NAD et FAD, DEYSSON et DELAGE concluent que la colchicine bloque le fonctionnement d'une chaîne enzymatique de transporteurs d'hydrogène nécessaire à la polymérisation de macromolécules tubulaires.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I - Matériel et technique

Pour l'étude que nous avons entreprise il nous a semblé que les méristèmes radiculaires d'Allium Sativum L. nous fourniraient un excellent matériel en raison de la netteté des images mitotiques caractérisées par des chromosomes peu nombreux, bien visibles, et de la simplicité de la manipulation. De plus, on peut espérer une grande homogénéité des individus traités puisque, provenant d'une même "tête", ils constituent un clone.

La technique, mise au point par DEYSSON (43), constitue le test Allium.

A - LE TEST ALLIUM

I - Germination

Des bulbes d'ail, appartenant à une même "tête", sont séparés avec précaution et soigneusement débarrassés des écailles externes de façon à ne pas causer de blessures. Seuls sont retenus les sujets d'apparence saine.

Grâce à des petits supports en carton, ils sont placés sur des flacons en verre à fond plat remplis de liquide de Knop (+) dilué au demi de telle sorte que la base des bulbes soit immergée de 1 mm environ. L'ensemble est alors mis à l'obscurité dans une pièce de culture tempérée à 23°C.

Au bout de 2 à 3 jours, les racines mesurent 1 à 2 cm et peuvent alors être utilisées pour l'expérimentation. Cependant, les bulbes qui présentent des racines irrégulières sont écartés.

2 - Mise en expérience

Une expérience comprend toujours un témoin et plusieurs bulbes d'essai. Ces derniers sont transférés sur des solutions du produit à étudier et l'on a soin que le niveau du liquide affleure la partie inférieure des bulbes.

(+) <u>Liquide de Knop</u>	Nitrate de calcium	0, 50 g.
	Nitrate de potassium	0, 125 g.
	Phosphate monopotassique	0, 125 g.
	Sulfate de magnésium	0, 125 g.
	Chlorure ferrique	traces
	Eau distillée	Q.S.P. 1 litre

Le produit à étudier est dissous soit dans le liquide de Knop dilué au demi, soit dans l'eau distillée, rarement dans un autre solvant, dans le cas où l'on veut éviter une interaction entre les sels minéraux du liquide nutritif et la substance.

Les concentrations essayées vont des concentrations inactives en 7 jours aux concentrations rapidement mortelles.

3 - Observation macroscopique

Avant chaque prélèvement, on notera les éventuelles modifications macroscopiques.

- Les racines peuvent devenir flaccides et translucides, à l'exception de la pointe radiculaire qui demeure opaque. Ces phénomènes témoignent d'une toxicité souvent irréversible.

- Au contact de la solution, une coloration peut apparaître et les racines peuvent montrer des tuméfactions, des constrictionnements méristématiques ; l'extrémité radiculaire peut, dans certains cas, être recourbée en "crochet".

- Enfin, l'allongement journalier peut être mesuré grâce à des repères faits sur le verre en face de chaque pointe radiculaire. La croissance peut être stimulée ou inhibée et il est parfois intéressant de dissocier les actions exercées sur l'activité mitotique et sur la croissance, les deux phénomènes pouvant se produire indépendamment l'un de l'autre ou simultanément.

4 - Observation microscopique

a/ Prélèvements : traitement continu

Les prélèvements sont effectués après 3 heures de traitement, après 24 heures, puis de 24 en 24 heures jusqu'à une semaine, à la fois chez les témoins et les sujets traités pour éviter l'influence des "poussées mitotiques", c'est-à-dire des périodes de division active en général synchrones chez tous les bulbes de même origine.

Les racines sont sectionnées à 1 mm, 1,5 mm environ de leur extrémité avec un scalpel parfaitement propre. Il est parfois possible d'éliminer la coiffe qui a tendance à desquamer. Le méristème entier renferme des cellules de coiffe, le cas échéant, facilement identifiables ; les cellules du centre quiescent de très faible activité mitotique ; les cellules de la zone de prolifération subapicale, fréquemment en mitose, isodiamétriques à cytoplasme dense et à rapport nucléoplasmique élevé, c'est-à-dire qu'elles possèdent en fait tous les caractères des cellules méristématiques ; enfin quelques rares cellules de la zone d'élongation aisément repérables par leur morphologie particulière.

b/ Coloration

Nous avons utilisé la technique de dissociation préconisée par DEYSSON (43) dans laquelle fixation et coloration se font simultanément.

Après leur prélèvement, les méristèmes sont rapidement plongés dans un mélange extemporané d'orcéine acétique (+) (1 ml) et d'acide chlorhydrique normal (0,1 ml) contenu dans une petite capsule qui est alors chauffée avec précaution sur la flamme d'un microbec Bunsen jusqu'à émission de vapeurs, puis recouverte d'une plaque de verre pour éviter l'évaporation.

Les méristèmes sont laissés au contact du colorant pendant 24 heures au maximum.

L'acide chlorhydrique intervient comme adjuvant de la coloration et comme agent hydrolisant de la membrane pectocellulosique, facilitant ainsi la dispersion des cellules.

c/ Montage

A l'issue du temps de coloration, chaque méristème est déposé sur une lame porte-objet, dans une goutte de colorant. On recouvre d'une lamelle et, par glissement, on écrase la pointe radiculaire de façon à obtenir une couche monocellulaire aussi uniforme que possible. L'excès de colorant est épongé et on lutte avec le mélange de RONDEAU du NOYER (4 parties de colophane pour une partie de lanoline).

Les noyaux et les chromosomes apparaissent en rose foncé dans un cytoplasme rose très pâle.

B - VARIANTES DE LA TECHNIQUE

I - La technique du "retour" : traitement discontinu

Cette technique se pratique au cours d'une expérience continue pour suivre la récupération cellulaire après une agression violente : détermination de la dose létale. Mais elle constitue également un excellent moyen pour révéler des effets invisibles ou peu nets en continu tels qu'une action chromatoclasique ou même une action mitoclasique temporaire.

(+) Orcéine acétique

Orcéine poudre	1 g.
Acide acétique cristallisable	45 ml.
Eau distillée	54 ml.

Dans ces conditions, les racines sont immergées pendant un temps déterminé dans une solution du produit à étudier. A l'issue du traitement, elles sont abondamment rincées à l'eau distillée, égouttées et placées sur du liquide de KNOP dilué au demi.

Les prélèvements sont effectués, en général, immédiatement après le traitement, puis d'heure en heure après la mise en "retour", et enfin de jour en jour s'il est nécessaire.

2 - Technique de "l'association" (PL 1)

Elle consiste à mettre en présence des méristèmes radiculaires et une solution renfermant deux composés utilisés chacun à la concentration maximale compatible avec un déroulement normal de la mitose. L'effet cytologique provoqué par l'association est suivi journalièrement pendant une semaine et il est comparé à l'effet exercé par chaque produit pris isolément.

Le protocole opératoire est le suivant :

4 bulbes d'ail, provenant d'une même "tête", sont mis en expérience.

- Le 1er reste pendant toute la durée de l'expérience sur le liquide de Knop dilué au demi et sert de témoin général.

- Les 2ème et 3ème bulbes sont placés respectivement sur une solution de l'un et de l'autre composé et constituent les témoins correspondants.

- Le 4ème est placé sur la solution mixte dans laquelle les 2 produits figurent à des concentrations identiques à celles qui sont utilisées dans les témoins.

3 - Technique de "l'antagonisme" (PL 2)

Jusqu'ici, cette variante du test Allium a été particulièrement fructueuse en ce qui concerne l'étude des antagonistes de la colchicine. Cependant, il peut s'adapter à d'autres cas à condition de respecter les principes essentiels :

a) L'agent mitoclasique et l'antagoniste présumé ne sont jamais administrés simultanément pour éviter une inactivation extracellulaire, toujours possible, de la substance mitoclasique.

b) L'agent mitoclasique est administré dans des conditions telles qu'il exerce une action intense mais fugace, c'est-à-dire qu'il doit être utilisé à la concentration-seuil mitoclasique évidemment variable en fonction du temps et de la température. Dans le cas de la colchicine, cette concentration est de $5 \cdot 10^{-7}$ mol/ml (15 mg %), et DEYSSON a précisé qu'à cette concentration un traitement de 1 heure à 25°C est suivi d'un effet mitoclasique total en 2 heures après la fin du traitement et qu'après 4 heures les mitoses redeviennent normales ; toute trace de l'effet mitoclasique a disparu en 24 heures.

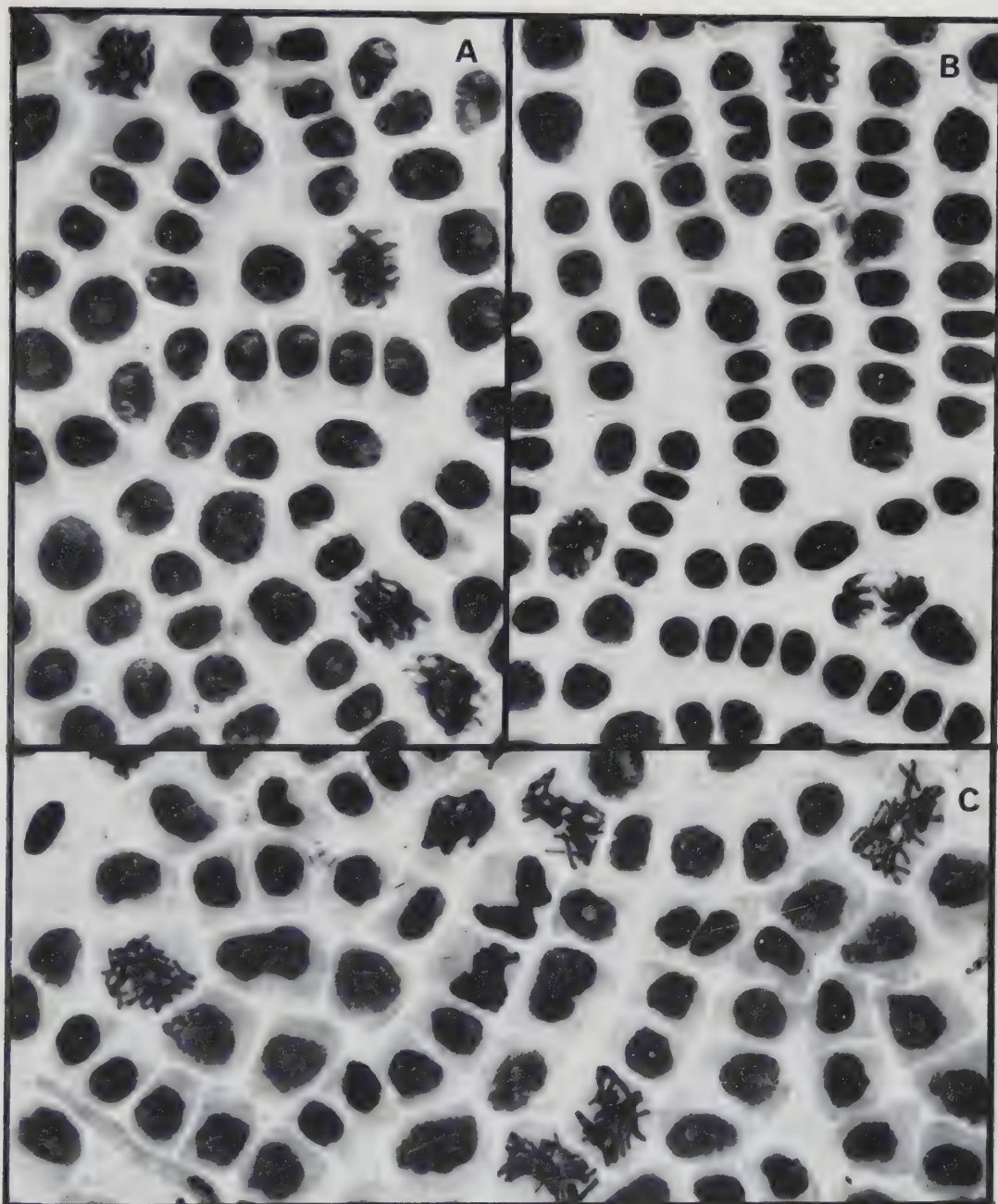


PLANCHE I

Association colchicine - 6 aminonicotinamide

Photo A : action de la colchicine, $7,5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml, 48 heures.
Mitoses normales.

Photo B : action du 6-aminonicotinamide, 10^{-5} mol/ml, 48 heures.
Mitoses normales. On note, néanmoins, une cellule à
noyau lobé.

Photo C : action combinée, effet mitoclasique.

c) L'influence de l'antagoniste est étudiée en fonction du temps par des prélèvements échelonnés car il est nécessaire de distinguer un véritable antagonisme d'un simple retard à l'effet mitoclasique ou d'un retour plus précoce à la normale.

d) Les concentrations choisies pour l'antagoniste éventuel sont celles qui ne causent pas d'altération cellulaire en 48 heures au minimum.

4 bulbes de même origine sont mis en expérience :

- Le 1er est laissé constamment sur le liquide de Knop dilué au demi et sert de témoin général.

- Le 2ème est traité pendant toute la durée de l'expérience par une solution de l'antagoniste supposé et sert de témoin correspondant.

- Le 3ème est placé sur le liquide de Knop pendant 24 heures puis soumis à l'action de l'agent mitoclasique dans les conditions déterminées précédemment. Après rinçages à l'eau distillée puis au liquide de Knop, il est mis "en retour" sur ce dernier. Ce bulbe constitue le témoin "mitoclasique".

- Le 4ème séjourne 24 heures dans une solution de l'antagoniste, après quoi les racines sont rincées avec un peu de solution de la substance mitoclasique et traitées comme le témoin. Elles sont mises "en retour" à la fin du traitement sur une solution de l'antagoniste.

Un prélèvement de contrôle est effectué avant l'action du "mitoclasique". Les suivants ont lieu après le traitement 2 h, 3 h, 4 h et 24 heures après le "retour".

C - LA MITOSE NORMALE ET SES MODIFICATIONS

La mitose normale se déroule en 4 phases désormais classiques :

- La prophase, caractérisée par l'apparition de bandes chromophiles dans le noyau, la disparition de la membrane nucléaire et des nucléoles et la mise en place du fuseau.

- La métaphase, durant laquelle les chromosomes fissurés se disposent en plaque équatoriale.

- L'anaphase, ou phase de migration polaire, s'accompagnant de la répartition équivalente des 2 lots de chromosomes-fils.

- La télophase au cours de laquelle se produisent le tassement polaire, la reconstitution nucléaire et l'apparition du phragmoplaste annonçant l'imminence de la cytodierèse.

Les anomalies de la mitose ont intéressé de nombreux auteurs et c'est à DEYSSON que nous emprunterons leur classification.

1 - Les troubles du fonctionnement fusorial (mitoclasie) :

Ils sont souvent accompagnés de troubles du cloisonnement.

a - Troubles du fuseau de caryocinèse

. Tropocinèse : défaut d'orientation de l'axe du fuseau qui devient oblique. Cette anomalie ne prend véritablement une signification que lorsqu'elle est très fréquente. Elle est visible à partir de la métaphase.

. Hémicinèses : troubles de la migration des chromosomes due à une altération du fuseau. Elles revêtent plusieurs aspects :

- Dislocation des pôles en plusieurs d'où résultent des mitoses pluripolaires visibles en anaphase et en télophase.

- Mitoses pratiquement normales avec des chromosomes retardataires qui donnent l'aspect de ponts qu'il faut alors distinguer des ponts d'agglutination.

- Inégale répartition des chromosomes au pôle.

. Stathmocinèses dont nous avons parlé à propos de la colchicine.

b - Troubles du fuseau de cytokinèse : troubles du cloisonnement

. Tropodiérèses : cloisons obliques

. Hémidierèses : cloisons incomplètes ou ramifiées isolant plusieurs fragments nucléaires ou cytoplasmiques.

. Stathmodiérèses : absence de cloison avec apparition de cellules binucléées ou polyploïdes.

2 - Altération des chromosomes (chromatoclasie) :

- Agglutination :

Ponts anaphasiques et télophasiques.

Mitoses abortives - Noyaux condensés.

- Fragmentation entraînant parfois des micronoyaux si le fragment chromosomique ne se recolle pas.

3 - Modification de l'entrée en mitose

Elles portent essentiellement sur le rythme des entrées en mitose :

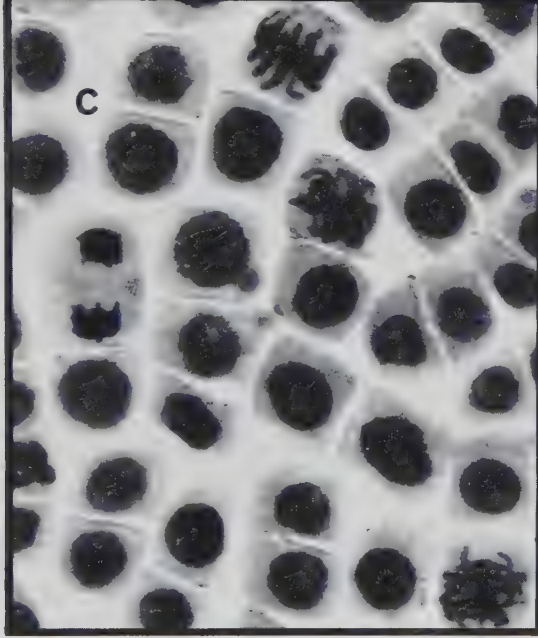
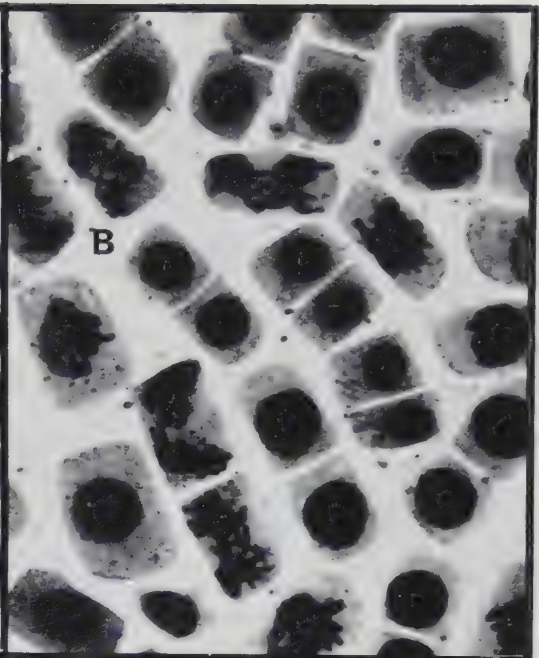
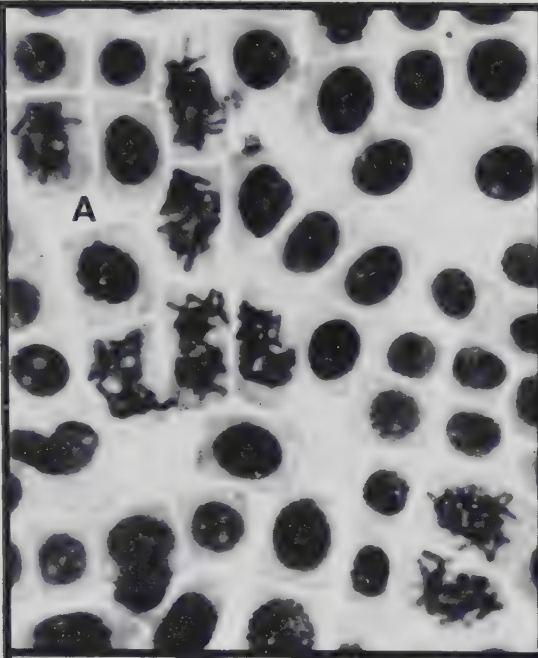


PLANCHE 2

Antagonisme colchicine - Dithiodiglycol

Photos A et B : cellules méristématiques ayant séjourné 24 heures sur liquide de Knop, 1 heure sur une solution de colchicine à 15 mg p. 100 g et 4 heures sur le liquide de Knop : action mitoclasique.

Photos C et D : cellules méristématiques ayant séjourné 24 heures sur une solution de dithiodiglycol à $2 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, 1 heure sur une solution de colchicine à 15 mg p. 100 g et 4 heures sur une solution de dithiodiglycol à $2 \cdot 10^{-6}$ mol/ml : mitoses normales

- Ralentissement des entrées en mitose qui conserve un aspect normal.
- Diminution de l'entrée en mitose et ralentissement des prophases et des télophases (accumulation de ces stades).
- Inhibition de l'entrée en prophase et blocage des prophases suivi de leur retour à l'état interphasique (inhibition préprophasique).

D - NUMERATION DES MITOSES

Les comptages portent sur 2 méristèmes différents au moins issus d'un même prélèvement.

- L'index mitotique est le nombre de cinèses comptées pour un total de 1.000 cellules. Cette détermination est effectuée sur 2.000 cellules au minimum, choisies parmi celles qui sont vraiment méristématiques et localisées en divers endroits de la préparation. L'index mitotique est variable : il diminue constamment au fur et à mesure que la racine s'allonge. Par contre, pour des racines de même longueur, il est constant.

En cas de mitodépression sévère, nous préférons indiquer le nombre total de cinèses existant dans le méristème.

- La formule mitotique exprime le pourcentage des différentes phases de la mitose. Cette détermination se fait sur un minimum de 300 mitoses. La formule mitotique est sensiblement identique au même moment pour toutes les racines quelle que soit leur longueur.

Les valeurs de l'index et de la formule permettent d'établir la fréquence des différentes phases pour 1.000 cellules.

"L'expression pour 1.000 cellules renseigne sur le nombre absolu de chaque stade" et permet de conclure à une "augmentation ou à une diminution de telle ou telle phase sous l'effet d'un traitement donné" (43).

"L'expression par rapport à 100 cinèses renseigne au contraire sur les proportions relatives des différents stades et il est essentiel de souligner que toute variation de l'un de ceux-ci entraîne une variation des autres en sens inverse sans que l'on puisse distinguer ici qu'elle est la variation réelle et quelles sont les variations apparentes. Ces nombres expriment en réalité les différences de durée des diverses phases" (43).

Seule la comparaison des deux modes d'expression permet une interprétation correcte des phénomènes.

Dans les essais d'"association" et d'"antagonisme", l'intensité de l'action mitoclasique est appréciée essentiellement d'après le rapport entre stathmométa-

phases et métaphases normales et non pas seulement d'après l'index mitotique ou le nombre total de métaphases. Il parait, en effet, indispensable de bien distinguer l'action exercée sur les modalités du déroulement de la mitose de l'action exercée sur le nombre de cellules entrant en mitose ou la durée de la mitose. Il est, par exemple, possible qu'un effet mitoclasique sévère s'accompagne d'une diminution du nombre des mitoses et qu'au contraire une accumulation d'images mitotiques se produise sans apparition de mitoses anormales.

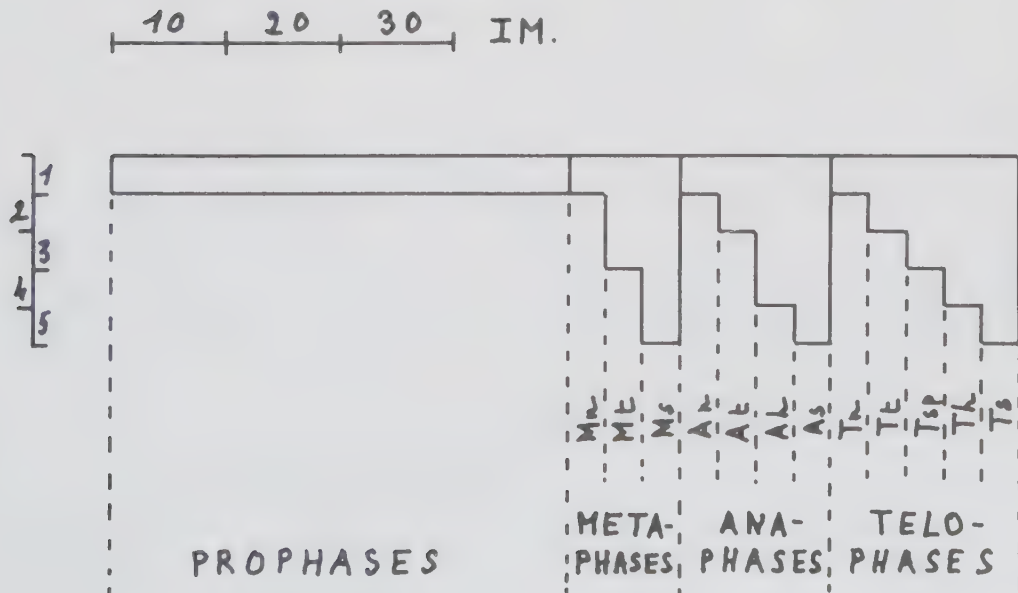
Représentation graphique des résultats

Nous adoptons le schéma de DEYSSON (43) établi d'après le principe suivant :

"La longueur totale du schéma sera proportionnelle à l'index mitotique (I M) de la population cellulaire considérée. La bande sera divisée en 4 segments représentant respectivement les prophases (P), les métaphases (M), les anaphases (A), les télophases (T). Son épaisseur variable rendra compte de l'intensité des troubles apportés à chaque stade".

5 unités d'épaisseur sont distinguées qui expriment :

- | | |
|--------------------------|------|
| 1 - les mitoses normales | (n) |
| 2 - les tropocinèses | (t) |
| 3 - les stathmodiérèses | (sp) |
| 4 - les hémicinèses | (h) |
| 5 - les stathmocinèses | (s) |



GRAPH N° 1 - Schéma de répartition

Suivant le stade auquel les anomalies sont visibles, les prophases seront toujours normales, les métaphases seront Mn, Mt, Ms, les anaphases seront An, At, Ah, As, les télophases seront Tn, Tt, Tsp, Th, Ts.

Quant aux troubles chromatoclasiques, ils seront figurés par des pointillés dont la longueur sera proportionnelle à la fréquence des troubles observés.

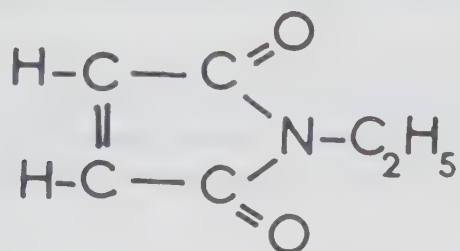
II - RESULTATS

A - INHIBITEURS DES GROUPEMENTS THIOLS

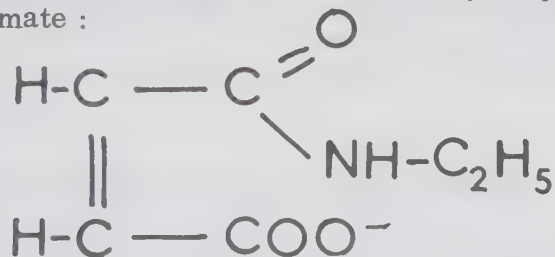
1 - Action cytologique du N - éthylmaléimide

Données bibliographiques

C'est à la suite de travaux relatifs à l'acide maléique que FRIEDMANN et ses collaborateurs vinrent à utiliser les imides d'acides dicarboxyliques insaturés. Ils établirent que ces composés étaient des inhibiteurs des groupements thiols et de puissants agents antimitotiques (67). Parmi les imides, le N - éthylmaléimide est vraisemblablement le plus récent mais aussi le plus employé pour les études enzymatiques et métaboliques (59, 193). Sa formule est la suivante :

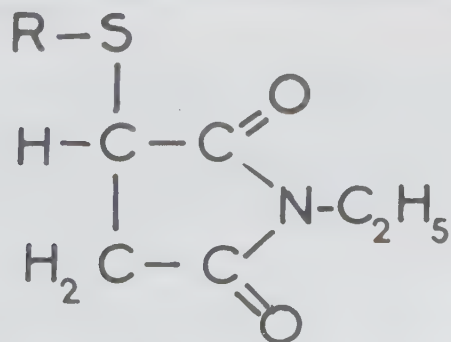


Il est stable à l'état cristallisé mais, en solution aqueuse et dans certaines conditions, le cycle pyrrole peut s'ouvrir par hydrolyse et il se forme alors le N - éthylmaléamate :



Son action sur les groupes thiols

La réaction du N - éthylmaléimide avec les groupes thiols est une réaction d'addition et, selon WEBB (193), le produit formé répond à la formule



Le produit issu de l'addition du N - éthylmaléimide et de la cystéine a été isolé (176).

Dans la plupart des cas, la rapidité de la réaction de l'inhibiteur avec les thiols est maximale pour des pH voisins de la neutralité. Mais la vitesse de réaction diminue avec le pH.

Le N - éthylmaléimide possède une certaine spécificité vis-à-vis des groupes thiols mais plusieurs auteurs ont montré qu'elle n'était pas aussi rigoureuse qu'on le supposait. En effet le N - éthylmaléimide peut réagir avec les groupements aminés du glycylalanine (175) et de l'hémoglobine (71).

Effets cytologiques

FRIEDMANN et coll. (67), les premiers, apportèrent la preuve que cette substance exerçait une action antimitotique extrêmement puissante en provoquant le blocage des métaphases, et ils montrèrent également que son effet sur les fibroblastes de poulet (68) était contrarié par un excès de glutathion (66).

KLIMEK (95), étudiant in vitro l'action du N - éthylmaléimide sur des cellules humaines tumorales, dégage 3 effets successifs : - le premier qui ne s'accompagne d'aucune modification ; - le second qui se caractérise par la perte du pouvoir de multiplication des cellules ; - enfin le troisième pour lequel l'action létale est rapide.

La sensibilité des cellules aux radiations ionisantes s'accroît en présence du N - éthylmaléimide (29, 30). L'hypothèse selon laquelle les rayons provoqueraient la réduction des liaisons disulfures en groupements thiols qui seraient alors bloqués par l'inhibiteur a été confirmée par LYNCH et HOWARD-FLANDERS (110) qui, non seulement, retrouvent l'effet sensibilisateur mais évaluent à 75 % la diminution des thiols cellulaires.

Effets biochimiques du N - éthylmaléimide

Il semble que l'inhibition enzymatique entraînée par le N - éthylmaléimide soit le plus souvent irréversible. ASAHI et coll (6) ont montré que, sous son action, la "protein-disulfide réductase" subit une réduction d'activité voisine de 42 %.

Les notions concernant l'action du N - éthylmaléimide sur le métabolisme sont très fragmentaires.

La respiration d'E. Coli. est inhibée (193) et, chez les levures, la glycolyse est fortement déprimée (195). De même, la synthèse des acides gras régresse notablement (28). Enfin, l'incorporation de la cytidine dans l'A R N des cellules HeLa est modérément réduite par le N - éthylmaléimide (177).

Résultats expérimentaux

a - traitement continu

La cytotoxicité du N -éthylmaléimide peut être définie de façon extrêmement simple : en traitement continu, les racines plongées dans des solutions de concentrations inférieures ou égales à $4. 10^{-8}$ mol/ml restent viables pendant 7 jours tandis qu'elles meurent bien avant la fin de l'expérience lorsque la concentration dépasse $5. 10^{-8}$ mol/ml.

Effet de concentrations échelonnées entre 10^{-10} mol / ml et $4. 10^{-8}$ mol / ml

Les seuls effets provoqués par cette gamme de concentration se réduisent à un ralentissement de croissance, à une modification de l'activité mitotique variable selon les méristèmes et à des anomalies très discrètes de l'appareil fusorial.

Les mesures de longueur moyenne des racines à l'issue d'un traitement de 7 jours montrent que la croissance est identique à celle des racines témoins pour des concentrations allant jusqu'à 10^{-9} mol/ml et qu'elle est constamment ralentie dès les premiers jours pour des concentrations comprises entre 10^{-9} mol/ml et $4. 10^{-8}$ mol/ml. Des tuméfactions de petit volume situées à 5 mm environ de l'extrémité radiculaire. apparaissent en 48 heures pour 3 et $4. 10^{-8}$ mol/ml.

L'activité mitotique, en général très peu déprimée, est variable selon les méristèmes, notamment pour les concentrations voisines du seuil létal : 3 et $4. 10^{-8}$ mol/ml.

Quant à l'appareil fusorial, il se forme et fonctionne normalement. Cependant, des altérations minimales peuvent prendre naissance surtout à partir de 10^{-8} mol/ml : métaphases désorganisées, anaphases en "étoile" toujours en petit nombre, cellules binucléées dont les premières apparaissent vers 10^{-9} mol/ml.

Effet de concentrations supérieures ou égales à $5. 10^{-8}$ mol / ml.

L'immersion dans des solutions de concentrations supérieures ou égales à $5. 10^{-8}$ mol/ml abrège progressivement la durée de vie des racines : 4 jours pour $5. 10^{-8}$ mol/ml, 48 heures pour $7. 5. 10^{-8}$ mol/ml et moins de 24 heures pour $10. 10^{-7}$ mol/ml. Au delà de cette concentration, la mort est brutale et survient même en moins de 3 heures à partir de 10^{-6} mol/ml.

L'inhibition de croissance est complète en 24 heures pour 5 et $7. 5. 10^{-8}$ mol/ml. Aucune anomalie morphologique importante n'a été notée, à l'exception de quelques racines en "crochet", après 24 heures à $7. 5. 10^{-8}$ mol/ml.

La cytologie, par contre, subit de très nettes perturbations. Un effet mitodépresseur se manifeste en 24 heures à $5. 10^{-8}$ mol/ml qui s'accroît pour les concentrations supérieures. Certaines cellules en mitose présentent des chromosomes courts et épais au moment où l'activité mitotique commence à diminuer. Les cinèses en cours sont cependant généralement normales à part quelques métaphases désorganisées, anaphases en "étoile" et télophases sans phragmoplaste. Au delà de 10^{-7} mol/ml, de nombreuses cinèses sont agglutinées en 3 heures parmi lesquelles il est possible d'apercevoir des stathmocinèses.

En somme, en dehors d'une extrême toxicité, aucun effet mitoclasique marqué ne se manifeste en traitement continu. C'est pourquoi nous avons procédé à toute une série d'essais "en retour".

b - traitement discontinu

Effet de la concentration $7,5. 10^{-8}$ mol / ml

Un traitement de 24 heures suivi d'un retour sur milieu normal ne s'accompagne d'aucune altération.

Effet de la concentration 10^{-7} mol / ml

Aucune inhibition fusoriale n'a été obtenue après 1 heure et 3 heures d'immersion. Mais, pour ce dernier temps, la chromatine est affectée : de nombreuses cinèses sont agglutinées. Dans les prélèvements effectués après la mise en retour, on note de très rares stathmométaphases à chromosomes trapus, quelques cellules binucléées et quelques cas de localisation aberrante du phragmoplaste que l'on n'avait jamais encore observée jusqu'ici dans nos expériences. En 24 heures, toutes les mitoses sont normales.

Effet de la concentration $2,5. 10^{-7}$ mol / ml

1 heure de traitement se traduit par une agression nucléaire intense. En effet, 2 heures après la mise "en retour", de nombreux noyaux quiescents ou en division sont agglutinés. On peut également observer quelques stathmométaphases abortives et, après 6 heures, les racines sont flaccides et translucides.

Effet de la concentration $5. 10^{-7}$ mol / ml

Une immersion de 30 minutes, suivie d'un séjour de 3 heures sur milieu normal, fait apparaître de nombreuses stathmocinèses noyées au milieu de noyaux quiescents pycnosés et des cinèses agglutinées. La mort survient en 24 heures.

Devant la présence des stathmocinèses, nous avons cru, en raccourcissant encore les temps de traitement, pouvoir agir électivement au niveau des fibres fusoriales en évitant une trop forte toxicité.

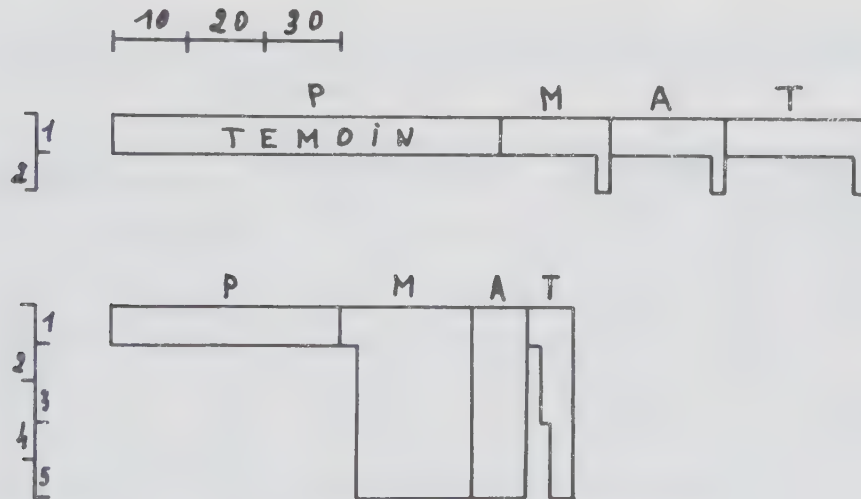
Des temps de 5 et 10 minutes ont été essayés, à l'issue desquels les bulbes ont été reportés sur le liquide de Knop.

Pour 5 minutes d'action, c'est l'effet mitodépresseur qui prédomine dans les prélèvements de "retour". La mort se produit en 4 jours.

Un traitement de 10 minutes est plus intéressant. A la fin du séjour dans la solution de N - éthylmaléimide, les index mitotiques sont un peu plus élevés que ceux du témoin (111,04 ‰ et 107,44 ‰ contre 103,34 ‰ et 101,02 ‰). On note quelques prophases en régression et quelques métaphases désorganisées. 50 % environ des télophases sont dépourvues de phragmoplaste.

Après 1 heure passée sur milieu normal, les racines accusent une baisse légère de leur activité mitotique. Les premiers signes d'inhibition fusoriale se manifestent sous forme de stathmométaphases et de métaphases en "étoile". En même temps, la proportion de prophases en régression augmente.

Puis la cytologie évolue d'heure en heure et, à la 4ème heure, les index mitotiques chutent de 40 environ. Les prophases représentent alors 10 % des mitoses totales tandis que l'altération fusoriale gagne en profondeur : 98 % des métaphases, 100 % des anaphases et 80 % des télophases sont des stathmocinèses et 10 % des télophases n'ont pas de phragmoplaste. Les cellules binucléées demeurent assez rares.



GRAPH N° 2 : N - éthylmaléimide $5 \cdot 10^{-7}$ mol/ml, 10 mnT, 4 h retour

Après 24 heures sur liquide de Knop dilué au demi, les numérations totales effectuées sur 2 méristèmes ont donné 5 stathmocinèses sur l'un et 9 sur l'autre.

Après 3 jours, les racines sont translucides et molles.

Ainsi, le N - éthylmaléimide n'exerce un effet mitoclasique appréciable que pour des temps de traitement très courts et cet effet est indissociable de l'action létale.

En résumé, le N - éthylmaléimide se montre en traitement continu extrêmement toxique et exerce un effet mito-dépresseur à partir de $5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml et un effet de fixation cellulaire pour des concentrations supérieures. Les conditions d'apparition des stathmocinèses sont limitées à des traitements en retour pour une seule concentration : $5 \cdot 10^{-7}$ mol/ml et un seul temps : 10 minutes.

ASSOCIATION COLCHICINE - N - ETHYLMALÉIMIDE

Nous avons utilisé deux concentrations de colchicine : $7,5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml et 10^{-7} mol/ml, et une concentration de N - éthylmaléimide $3 \cdot 10^{-8}$ mol/ml.

a - Colchicine $7,5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml - N - éthylmaléimide $3 \cdot 10^{-8}$ mol/ml

Les racines traitées par le N - éthylmaléimide n'ont montré aucune anomalie cytologique ou morphologique.

Les racines traitées par la colchicine et par les 2 composés n'ont révélé que de très rares altérations et aucune différence marquante n'a pu être mise en évidence.

b - Colchicine 10^{-7} mol/ml - N - éthylmaléimide $3 \cdot 10^{-8}$ mol/ml

TABLEAU N° 1

Prélèvement	N-éthylmaléimide seul	Colchicine seule	Colchicine + N-éthylmaléimide
3 h	0 et 0	3 et 3	13 et 10
24 h	0 et 0	34 et 21	12 et 7
48 h	0 et 0	9 et 11	19 et 7
72 h	0 et 0	36 et 37	70 et 65

Stathmométaphases pour 100 métaphases

Après 3 heures de traitement par la colchicine seule, les troubles de la mitose sont très rares et se réduisent à quelques stathmocinèses, anaphases en "étoile" et télophases sans phragmoplaste.

En 24 heures, on enregistre une activité mitoclasique assez forte se traduisant par l'apparition de stathmocinèses, d'hémicinèses et de cellules polyploïdes.

Au delà de 24 heures, la croissance des racines est pratiquement arrêtée et les régions subméristématiques sont légèrement tuméfiées. L'activité mitoclasique diminue, reprend au 3ème jour mais n'est jamais totale.

Les racines traitées par le N - éthylmaléimide seul ne subissent ni ralentissement de croissance ni altération cytologique.

Les racines traitées par l'association colchicine - N - éthylmaléimide voient leur croissance arrêtée en 48 heures et présentent des tuméfactions subterminales. Une action mitoclasique discrète se manifeste en 3 heures. Elle n'évolue pas jusqu'au 3ème jour où elle devient alors sensiblement supérieure à celle du lot colchicine. Néanmoins, les mitoses normales demeurent fréquentes.

Au delà du 4ème jour, des méristèmes sont différenciés, mais les conséquences de l'action mitoclasique sont encore observables sous forme de cellules polyploïdes.

L'association ne provoque donc une inhibition fusoriale appréciable qu'à la condition que la concentration de colchicine employée soit légèrement mitoclasique.

Ainsi le N - éthylmaléimide peut, grâce à sa double liaison, inactiver les - SH par une réaction d'addition. Mais il existe également un groupe de substances minérales ou organiques, caractérisé par la présence d'un cation métallique lourd, doué d'une affinité particulière pour les groupements sulfhydrylés. Pour cette raison, on les a dénommés les poisons "thioloprives". Parmi eux, il faut citer les dérivés du plomb et les dérivés du mercure. Ces derniers ont attiré l'attention de nombreux auteurs en raison de leurs propriétés fongicides.

Nous avons voulu comparer les effets du N - éthylmaléimide à ceux d'un organomiercuriel, l'hydroxyde de phénylmercure, qui réagit avec les - SH selon l'équation :



2 - Action cytologique de l'Hydroxyde de phénylmercure

Données bibliographiques

Effets cytologiques des dérivés mercuriels

Les premières observations de l'action cytologique des dérivés mercuriels sont dues à SASS (164) et à KOSTOFF (96) qui rapportent l'effet stathmocinétisant du phosphate et du chlorure d'éthylmercure qu'exercent aussi des sels minéraux (103).

La comparaison de dérivés organiques et minéraux, respectivement le diphénylmercure, certains sels d'éthylmercure et le bichlorure de mercure, amène MANGENOT et CARPENTIER (117) à conclure que, de ces composés, tous mitoclasiques, le diphénylmercure est le moins nocif mais provoque la tuméfaction des méristèmes tandis que les autres, beaucoup plus toxiques, tuent les racines avant que ce phénomène puisse se manifester.

Les dérivés du phénylmercure, essentiellement nitrate basique et hydroxyde, possèdent des propriétés mitoclasiques intenses même à très faibles concentrations. Ils sont responsables de l'apparition de stathmocinèses, de mitoses pluripolaires et polyploïdes, accompagnée d'une inhibition de la croissance et de la tuméfaction des méristèmes radiculaires. Ils provoquent également des altérations chromosomiques conduisant à des fragmentations, à des mutations somatiques et à la stérilité du pollen chez les plantes à fleurs (112, 116).

Les anomalies provoquées par les dérivés du phénylmercure ont été classées en 4 groupes suivant leur intensité sur les racines d'Allium (115).

Groupe 1 - Croissance inhibée ou non - action très faible sur la mitose.

Groupe 2 - Arrêt de croissance, tuméfactions - action mitoclasique légère.

Groupe 3 - Arrêt de croissance, tuméfactions - action mitoclasique prononcée avec polyploïdie.

Groupe 4 - Mort.

L'acide parachloromercuribenzoïque, ou son sel de sodium, réactif de choix pour l'étude des thiols enzymatiques, détermine une inhibition fusoriale aussi franche que celle de la colchicine, mais beaucoup plus durable, puisque les séquelles de l'intoxication sont encore présentes après plusieurs jours (5).

Plus récemment, à l'aide du test Allium, deux auteurs suédois, FISKESJO (63) qui a étudié le bromure de butylmercure, les chlorures de méthylmercure, de méthoxyéthylmercure, d'éthylmercure, et RAMEL (150) qui a étudié les aberrations génétiques causées par le dicyandiamide de méthylmercure, les hydroxydes de méthyl- et de phénylmercure et le chlorure de méthoxyéthylmercure, trouvent constamment une action mitoclasique et une action chromatoclasique. Ils signalent qu'aux environs de la concentration-seuil mitoclasique l'aspect des mitoses est extrêmement variable et que tous les intermédiaires sont possibles entre des stathmocinèses vraies et des mitoses normales.

Ainsi, tous ces travaux établissent que les dérivés mercuriels sont des agents toxiques, mitoclasiques, chromatoclasiques, générateurs de tuméfactions et de polyploïdie.

Effet biochimique

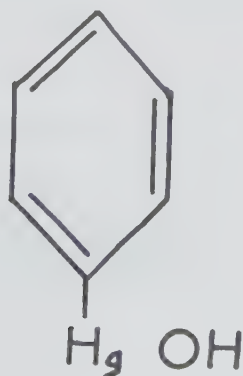
C'est évidemment au blocage des groupements thiols qu'on a attribué les symptômes de l'intoxication mercurielle. De nombreuses études biochimiques ont été entreprises à ce sujet.

COOK et coll (36) démontrent que le nitrate de phénylmercure est un poison respiratoire qui s'attaque, probablement, aux groupes - SH de la succino-déshydrogénase et qui inhibe les déshydrogénases du lactose et du glucose ainsi que la cytochrome-oxydase et la catalase.

Sur des racines d'A. Cepa, Mc FARLANE et NADEAU (114) décrivent l'effet macroscopique de poisons respiratoires dérivés du mercure et montrent qu'il est possible de contrarier ces effets par un extrait aqueux de levure de bière. Plus tard, Mc FARLANE (113) montre qu'on peut protéger des racines contre l'action létale de dérivés mercuriels en administrant simultanément un extrait alcoolique de levure de bière, la cystéine et le glutathion.

RAMEL (150) confirme l'antagonisme entre un organomercuriel et une substance soufrée, le BAL.

Données expérimentales



PM = 295

L'hydroxyde de phénylmercure est une poudre microcristalline blanche, peu soluble dans l'eau. Dans nos expériences, nous avons pris la précaution de dissoudre l'hydroxyde de phénylmercure dans l'eau distillée pour éviter une interaction possible entre les sels du liquide de Knop et le cation Hg^{2+} . Les dilutions ultérieures peuvent être faites sans inconvénient avec du liquide de Knop.

a - Traitement continu

Parmi les concentrations allant de 10^{-10} mol/ml à 10^{-7} mol/ml, auxquelles ont été soumises les racines d'Allium, 3 groupes peuvent être distingués :

- Les concentrations inférieures à $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml, compatibles avec une activité cellulaire normale,

- La concentration $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml, caractérisée par une extrême variation de ses effets,

- Les concentrations supérieures à $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml, rapidement mortelles.

Effet des concentrations inférieures à $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml.

La croissance, légèrement stimulée par la plus faible des concentrations, est égale ou légèrement inférieure à celle des racines témoins pour les concentrations plus élevées.

Aux concentrations de 10^{-9} mol/ml et $1,25 \cdot 10^{-9}$ mol/ml, on ne décèle que de très rares anomalies chez les racines traitées : quelques plaques métaphasiques mal formées, des anaphases dites "lâches" c'est-à-dire des anaphases à pôles larges et à chromosomes non convergents. Parallèlement, un effet chromatoclasique s'exerce et se traduit par la présence de fragmentations et de micronoyaux, peu nombreux mais constants.

Les premiers symptômes de l'action sur la chromatine surgissent en 24 heures pour une concentration de $2,5 \cdot 10^{-10}$ mol/ml mais sont absolument inexistantes à 10^{-10} mol/ml même après 7 jours de traitement.

En résumé, pour ces concentrations, seule l'action chromatoclasique s'exprime.

Effet de la concentration $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml

Cette concentration a fait l'objet de nombreux essais car, dès les premiers prélèvements, les réponses les plus diverses ont été obtenues non seulement d'un bulbe à l'autre mais d'une racine à l'autre d'une même "tête".

La croissance radiculaire, ralentie dès 24 heures, est plus ou moins inhibée les jours suivants. Le degré d'inhibition varie selon les méristèmes. C'est ainsi que certaines racines ont une croissance appréciable tandis que des racines voisines appartenant au même bulbe ne montrent aucun allongement.

A partir du 3ème jour, puis de 24 heures en 24 heures, un petit nombre de racines deviennent translucides et flaccides et l'examen cytologique indique alors un aspect létal très net. Cependant, la mort d'un bulbe entier, en 3 jours, ne s'est produite qu'une fois, les autres bulbes ayant survécu à 7 jours de traitement continu et n'ayant perdu que quelques racines les jours précédents.

La cytologie varie également tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif.

L'activité mitotique, normale en 3 heures, se trouve partiellement ou totalement inhibée en 24 heures pour la plupart des méristèmes mais tend à se rétablir les jours suivants. En effet, en 48 heures et au-delà jusqu'à 7 jours, les racines encore vivantes présentent autant de divisions que les racines témoins et même parfois plus, ce qui est l'indice d'un ralentissement de la mitose. Dans quelques cas, une mitodépression plus ou moins accentuée, mais exceptionnellement totale, survient après 48 heures.

La variabilité qui caractérise la croissance, la mortalité, l'activité mitotique affecte également la nature des cinèses. Le plus souvent pratiquement inaltérées en 3 et 24 heures pour bon nombre de méristèmes, les mitoses peuvent néanmoins offrir, pour quelques racines privilégiées, un large éventail d'anomalies : plaques métaphasiques plus ou moins nettes, métaphases en "étoile" toujours rares, anaphases "lâches" ou en "étoile", télophases sans phragmoplaste, ou bien, à côté de ces anomalies mineures, des hémicinèses, des stathmocinèses, des noyaux lobés, irréguliers, des cellules binucléées peu nombreuses.

Il importe de souligner que cette action mitoclasique, totale ou partielle, s'accompagne toujours d'une mitodépression légère ou sévère. Tous les intermédiaires peuvent exister en fonction de l'intensité de la mitoclasie et de l'intensité de la mitodépression.

Dans un seul cas, les mitoses d'un méristème étaient rigoureusement normales alors qu'un méristème de la même "tête" montrait un aspect létal avancé avec des stathmocinèses agglutinées.

En 48 heures et au-delà, les prélèvements témoignent de la même diversité cytologique. L'appareil fusorial fonctionne normalement dans la plupart des cas mais il est encore possible de rencontrer une activité mitoclasique assez élevée caractérisée par un mélange de stathmocinèses et d'hémicinèses. Cependant, après 48 heures, on peut affirmer que la suppression complète du fonctionnement fusorial est exceptionnelle.

Enfin, l'effet sur la chromatine, discret en 3 heures et 24 heures, sauf dans un cas, s'exprime surtout en 48 heures sous forme de fragmentations, de micronoyaux et de ponts ana- et télophasiques. Là encore, on constate la variabilité de cet effet selon les méristèmes mais, à la différence de l'inhibition fusoriale, les manifestations de la chromatoclasie se poursuivent jusqu'à la fin de l'expérience.

En résumé, cette concentration représente la concentration-seuil mitoclasique et létale.

Effet des concentrations supérieures à $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml

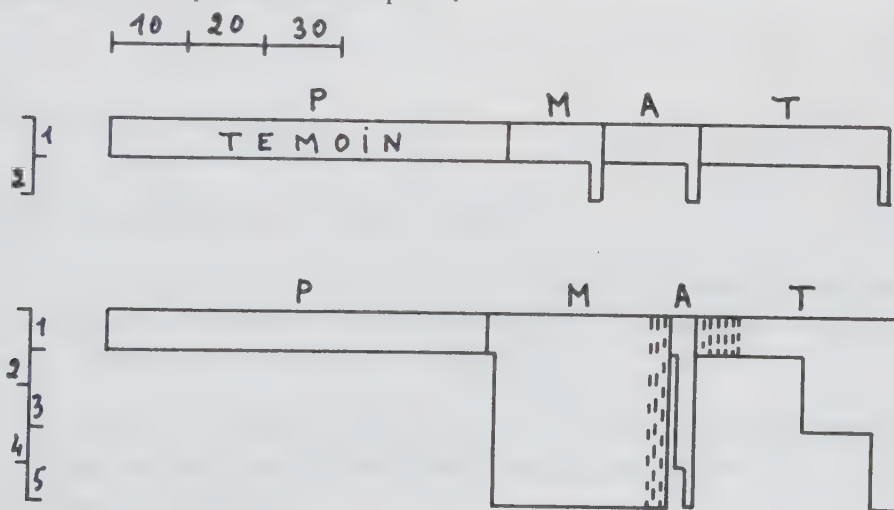
La survie des cellules méristématiques, plongées dans les solutions de concentration allant de $5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml à 10^{-7} mol/ml, n'excède jamais 24 heures.

A 10^{-7} mol/ml, l'effet se traduit par une véritable fixation cellulaire : en moins de 3 heures les racines sont flaccides, les mitoses agglutinées, les nucléoles dilatés et la chromatine des noyaux quiescents très condensée.

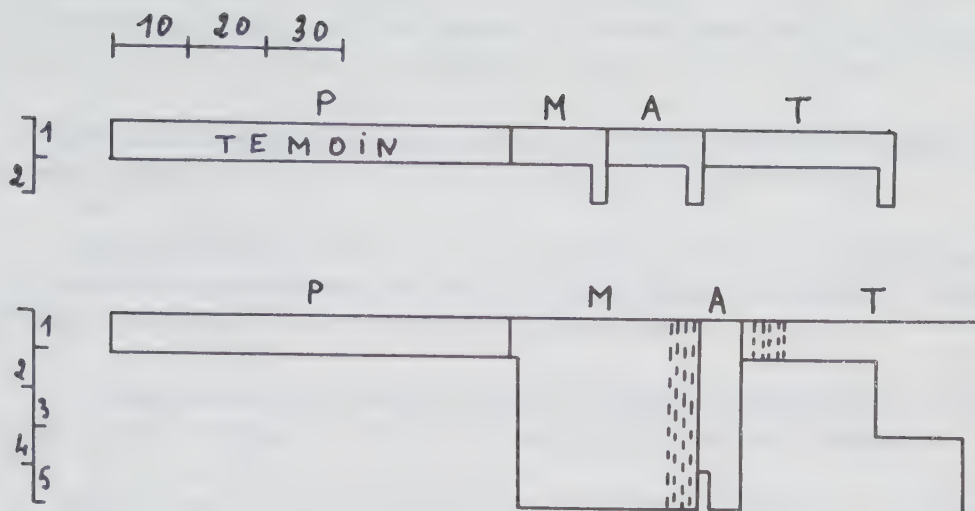
Un prélèvement effectué à l'issue de 3 heures de traitement par 10^{-8} mol/ml et $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml et $5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml révèle une profonde atteinte des métaphases dont la plupart sont à l'état de stathmocinèses. Les index mitotiques, un peu supérieurs à ceux des racines témoins, signalent un ralentissement de la mitose. Quelques mitoses sont agglutinées.

En même temps, on note des ponts, des fragmentations mais ils restent toujours peu abondants.

A ces concentrations, la mort survient en 24 heures alors que les divisions ont complètement disparu.



GRAPH N° 3 : Hydroxyde de phénylmercure, $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml 3 heures



GRAPH n° 4 : Hydroxyde de phénylmercure, $5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml, 3 heures

En résumé, l'effet mitoclasique, produit par ces concentrations, est indissociable de l'action létale qui est toujours rapide.

En traitement continu, il est donc difficile d'obtenir une action mitoclasique totale sans tuer les racines. C'est pourquoi l'hydroxyde de phénylmercure a été utilisé en traitements brefs de 1 et 3 heures et les racines d'Allium ont été placées, à l'issue de ce traitement, sur un milieu neuf. Les prélèvements ont été effectués 2 heures - 3 heures et 4 heures après la mise "en retour", puis de 24 heures en 24 heures.

b - Traitement discontinu

Effet de la concentration $5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml

Tout d'abord, il faut remarquer que des temps de traitement de 1 heure et 3 heures par cette concentration ne sont pas compatibles avec la survie des racines au delà de 24 heures "de retour".

Après 1 heure de traitement, une mitodépression s'installe. Quelques stathmométaphases apparaissent tandis que les télophases sont, pour la majorité d'entre elles, agglutinées.

Après 2 heures "de retour", la mitodépression semble régresser mais l'effet mitoclasique s'étend aux anaphases et devient total pour les métaphases et les anaphases. Les télophases ont toujours un aspect très condensé.

Dans les prélèvements suivants, la mitodépression est sévère, les mitoses sont fixées mais les noyaux au repos ont un aspect normal.

Après 24 heures "de retour", les racines, molles, dégagent une forte odeur alliagée. Au microscope, les noyaux apparaissent condensés, les nucléoles dilatés et les quelques mitoses restantes agglutinées.

Un traitement de 3 heures produit d'emblée l'agglutination des mitoses et 3 heures après la mise "en retour", l'aspect létal est très avancé.

En résumé, l'emploi de cette concentration ne permet pas le développement de l'effet stathmocinétisant sans toxicité générale.

Effet de la concentration $2.5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml.

Après 1 heure de traitement, les mitoses nombreuses sont constituées surtout par un mélange d'images normales et désorganisées, parmi lesquelles les stathmocinèses restent rares. La toxicité s'exprime encore, en premier lieu, sur les télophases le plus souvent agglutinées.

Après 2 heures de retour, débute une mitodépression qui va en s'accroissant pour devenir totale après 24 heures de retour. L'ensemble des métaphases et des anaphases est à l'état de stathmocinèses et quelques cellules binucléées apparaissent.

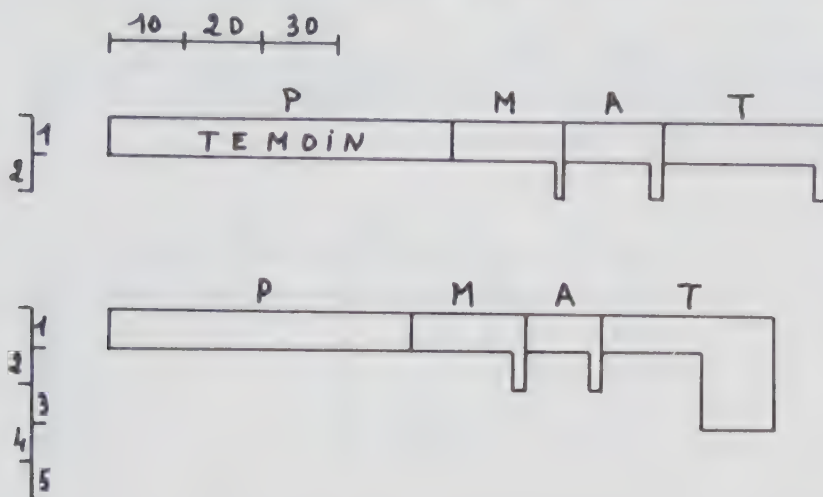
Après 4 heures de retour, certaines stathmocinèses sont agglutinées et les racines deviennent molles et translucides.

3 heures de traitement par l'organomercure avant la mise en retour détermine une évolution cytologique identique, mais plus rapide, car, dès la fin du traitement, quelques mitoses sont fixées. L'effet mitoclasique, total, s'accompagne toujours d'une forte diminution des mitoses en 2, 3 et 4 heures de retour. Après 24 heures, les racines sont mortes.

En somme, pour cette concentration, comme pour la précédente, il n'est pas possible de dissocier l'inhibition fusoriale de l'action toxique.

Effet de la concentration 10^{-8} mol/ml.

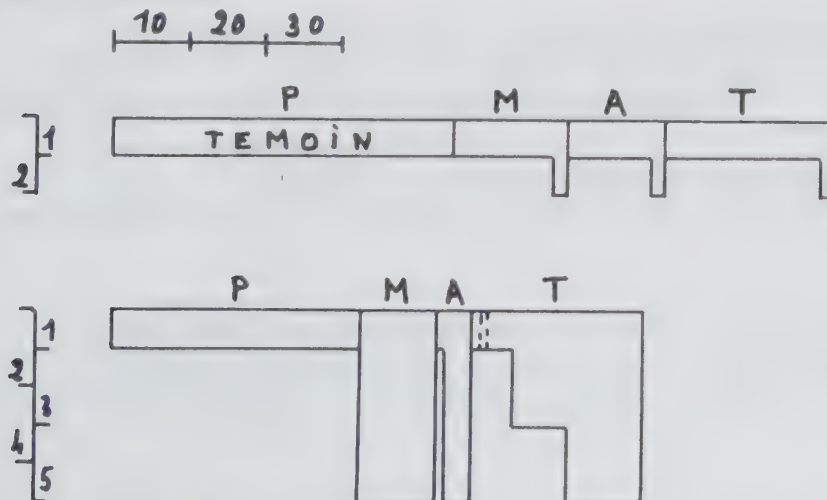
Après 1 heure de traitement, des métaphases désorganisées et des télophases sans phragmoplaste constituent les seules anomalies observables alors que l'activité mitotique peut varier légèrement d'un meristème d'une heure à l'autre.



GRAPH n° 5 : Hydroxyde de phénylmercure, 10^{-8} mol/ml, 1 h traitement

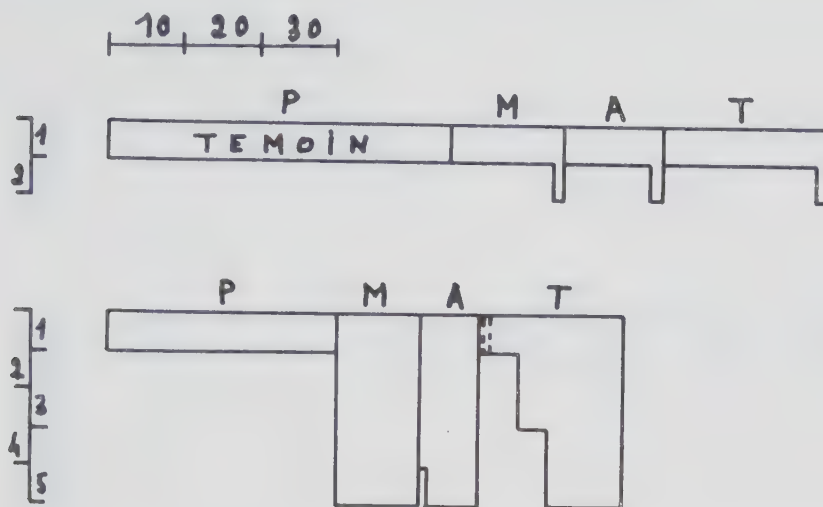
Après 2 heures de retour, métaphases et anaphases sont toutes des stathmocinèses mais environ 25 % des télophases restent normales. En même temps, on note des prophases en régression et des cellules binucléées.

En 3 heures de retour, la quantité de cinèses diminue et le tiers environ est en télophase. L'effet stathmocinétisant intéresse à la fois les métaphases, les anaphases et les télophases. L'action sur la chromatine se traduit par des ponts télophasiques. L'inhibition du fuseau de cytokinèse entraîne la présence de nombreuses cellules binucléées.



GRAPH n° 6 : Hydroxyde de phénylmercure, 10^{-8} mol/ml, 3 h Retour

En 4 heures de retour la totalité des métaphases et des anaphases est sans fuseau tandis que 67 % des télophases sont des stathmotélophases. Les index sont très abaissés.



GRAPH n° 7 : Hydroxyde de phénylmercure, 10^{-8} mol/ml, 4 h retour

Vingt-quatre heures après la fin du traitement, les racines, morphologiquement normales, n'ont subi aucun allongement. L'examen cytologique et les déterminations numériques montrent que l'effet mitodépresseur est extrêmement prononcé et que l'inhibition fusoriale est totale. De nombreuses prophases présentent une tendance à retourner à l'état interphasique.

Après 48 heures de "retour", la plupart des racines sont mortes, mais celles qui ont survécu ne se sont pas allongées et portent de légères tuméfactions sus-méristématiques. Les mitoses sont redevenues normales, à l'exception de quelques anaphases en étoile et de quelques télophases sans phragmoplaste. Les micronoyaux sont fréquents.

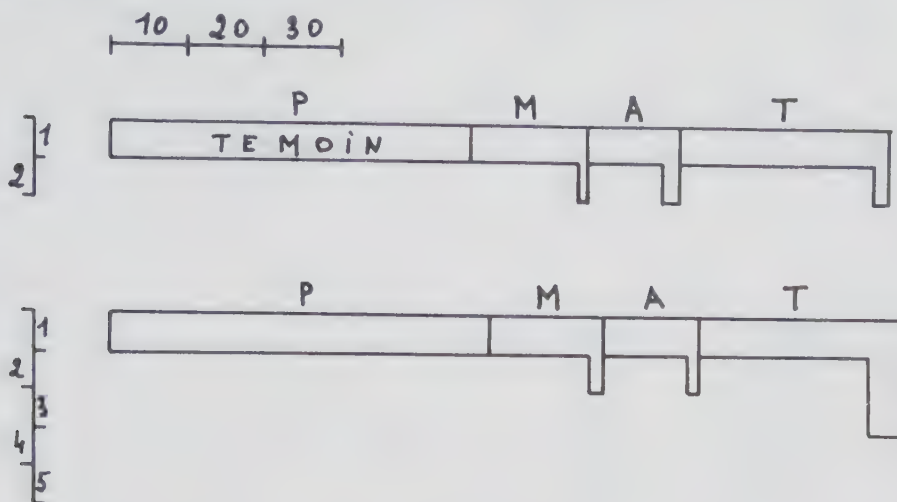
La croissance des racines résistantes reste bloquée jusqu'au 6ème jour. A ce moment, les extrémités radiculaires sont épaissies et des vestiges de l'intoxication sont visibles sous forme de mitoses polyploïdes.

Pour un traitement de 3 heures avant retour sur milieu neuf, des signes de mort apparaissent en 24 heures de "retour". En 48 heures, aucune racine ne survit.

Donc, pour cette concentration, un traitement d'une heure permet de séparer l'effet mitoclasique de l'effet toxique mais cette dissociation dépend essentiellement de la sensibilité individuelle de chaque méristème.

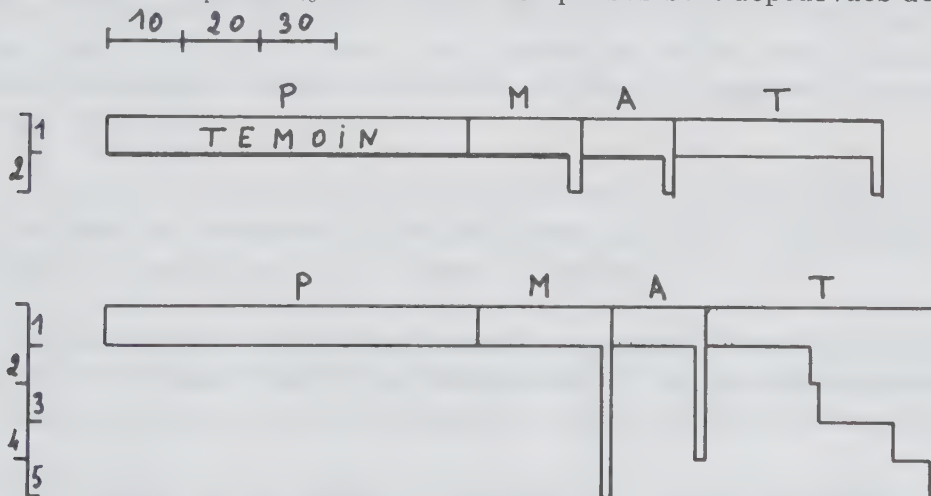
Effet de la concentration $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml

Une immersion d'une heure ne cause pas d'altérations importantes du fonctionnement fusorial ni de l'activité mitotique.



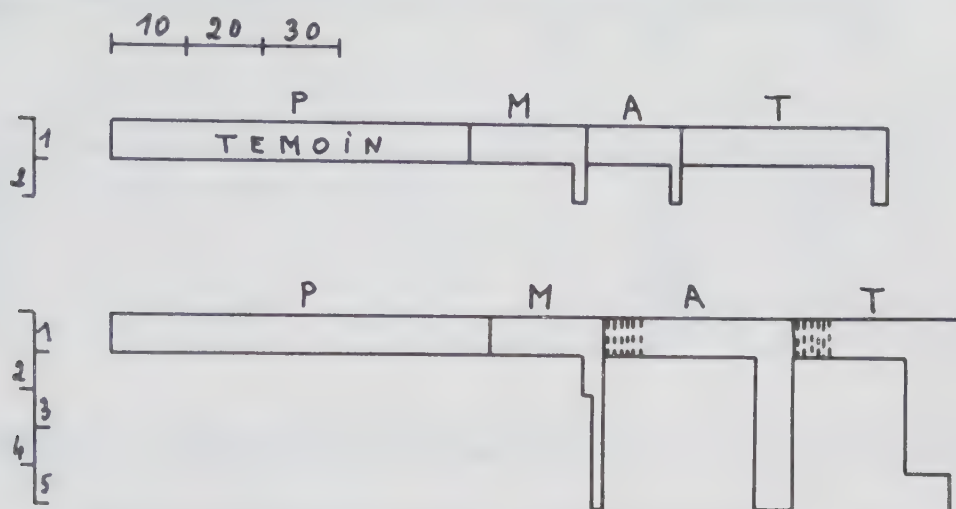
GRAPH n° 8 : Hydroxyde de phénylmercure, $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml, 1 h traitement

Une légère élévation de l'index mitotique se produit 2 heures après la mise en retour, vraisemblablement due à un ralentissement du rythme de division. Dans le même temps, les premières stathmométaphases apparaissent mélangées à des hémianaphases et à des hémitélophases. Cependant, l'effet mitoclasique reste partiel et minime. Les ponts d'agglutination anaphasiques et télophasiques sont nombreux tandis que 28 % environ des télophases sont dépourvues de phragmoplaste.



GRAPH n° 9 : Hydroxyde de phénylmercure, $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml, 2 h Retour

Après 3 heures de retour, l'action mitoclasique, peu intense, se traduit essentiellement par des hémitélophases et des stathmoanaphases. En revanche, l'effet sur les chromosomes s'intensifie : ponts et fragmentation sont en nombre croissant.



GRAPH n° 10 : Hydroxyde de phénylmercure, $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml, 3 h Retour

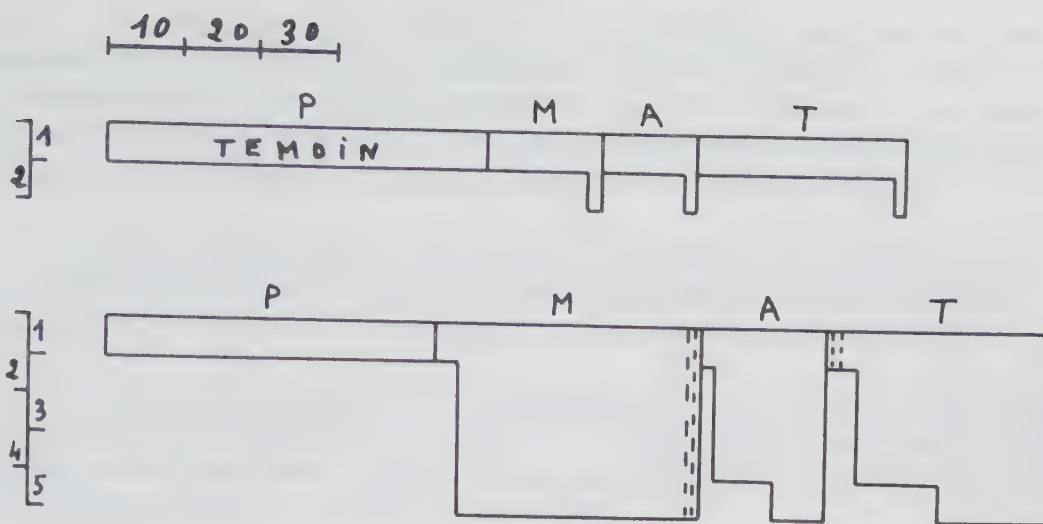
En 4 heures de retour, toutes les anomalies fusoriales ont disparu pour 4 méristèmes, mais, pour une racine, les numérations ont donné 22,66 % de stathmométaphases et 11,33 % de stathmotélophases. Les ponts d'agglutination demeurent généralement très nombreux.

Après 24 heures "de retour", les méristèmes apparaissent légèrement tuméfiés et la croissance, bien que très réduite, n'est pas complètement bloquée et redevient égale au témoin le 3ème jour. Pendant ce temps, les mitoses sont rigoureusement normales et seuls quelques micronoyaux témoignent d'une action chromotoclasique antérieure.

En somme, une heure de traitement par cette concentration est dénuée de toxicité mais ne détermine qu'une mitoclasie partielle. C'est pourquoi, l'action de la même concentration a été allongée à 3 heures.

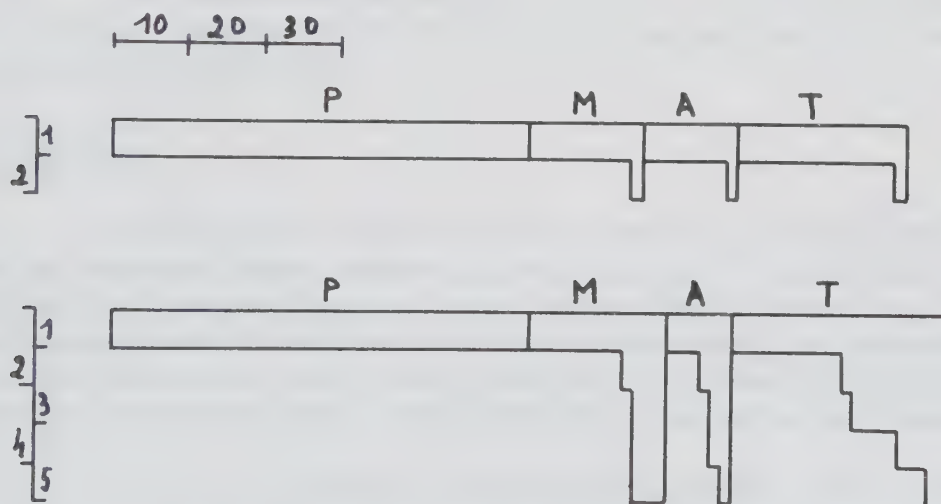
Dans ce cas, l'inhibition fusoriale se produit d'emblée à la fin du traitement : la presque totalité des métaphases sont des stathmocinèses mais on note aussi des hémiana - et hémitélophases ainsi que des ponts d'agglutination.

En 2 heures de "retour", les mitoses normales ont disparu. Ce sont les stathmocinèses qui prédominent. Les index mitotiques sont élevés.



GRAPH n° 11 : Hydroxyde de phénylmercure, $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml, 2 h Retour

Après un "retour" de 3 heures, la baisse de l'index mitotique coïncide avec la réapparition de mitoses normales mais les troubles fusoriaux persistent néanmoins sous forme de stathmocinèses et d'hémicinèses. Les cellules à noyaux lobés ou les cellules plurinucléées, assez fréquentes, constituent les vestiges d'une action maintenant terminée. Les ponts et les fragmentations touchent quelques cellules.



GRAPH n° 12 : Hydroxyde de phénylmercure, $7,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml, 3 h Retour

Après 4 heures de "retour", il est possible d'observer tous les stades intermédiaires entre une action mitoclasique encore totale et un aspect mitotique strictement normal. Les index mitotiques sont très variables et, en gros, on peut dire qu'à l'effet mitoclasique correspond un indice élevé tandis que des mitoses normales s'accompagnent d'un index comparable à celui du témoin.

Un retour de 24 heures permet la reprise de la croissance mais celle-ci est encore très réduite. Les extrémités méristématiques sont tuméfiées. Au point de vue de la cytologie, on note seulement quelques cellules polyploïdes.

Ce n'est qu'après 3 jours de séjour sur milieu normal que la croissance des racines encore tuméfiées reprend à peu près normalement. Quelques fragmentations chromosomiques, toujours rares, apparaissent au milieu de mitoses normales et nombreuses mais di - tetra-ou polyploïdes.

En résumé, l'inhibition fusoriale est relativement fugace et le retour à la normale est variable avec chaque racine.

Effet de la concentration $5, 10^{-9}$ mol/ml

Un traitement d'une heure et "retour" ne se signale que par quelques troubles chromatoclasiques. La croissance, très ralentie, ne reprend à un rythme normal qu'après une immersion de 3 jours sur liquide de Knop.

Si le traitement est prolongé à 3 heures, l'effet mitoclasique n'est total ni à l'issue du traitement ni durant le retour. Quelques cellules binucléées, en mitose, apparaissent le 3ème jour.

Conclusion

L'hydroxyde de phénylmercure se révèle d'abord chromatoclasique pour des concentrations supérieures ou égales à $2, 5 \cdot 10^{-10}$ mol/ml en 24 heures. Mito-dépresseur, il devient également mitoclasique à partir de $2, 5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml, concentration pour laquelle les premiers signes de mort se manifestent. Au voisinage de cette concentration-seuil, la morphologie des mitoses revêt les aspects les plus variables, allant des cinèses rigoureusement normales aux stathmocinèses vraies.

Pour les concentrations supérieures, l'inhibition fusoriale se généralise mais en même temps la mort survient de plus en plus rapidement.

Lorsque les concentrations permettent le développement d'un effet mitoclasique intense mais fugace, celui-ci est parfaitement réversible.

ASSOCIATION COLCHICINE - HYDROXYDE DE PHÉNYLMERCURE

Nous n'avons utilisé qu'une seule concentration de colchicine $7,5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml, et une concentration d'hydroxyde de phénylmercure 10^{-9} mol/ml.

Les racines traitées par la colchicine seule subissent un ralentissement de croissance en 48 heures et leurs extrémités se boursouflent le 3^{ème} jour. Apparues en 24 heures, les troubles fusoriaux se développent surtout en 2 et 3 jours mais ne se généralisent pas et s'accompagnent donc d'un mélange d'images normales, d'hémicinèses, de stathmocinèses, de cellules polyploïdes quiescentes ou en cinèse. Passé le 3^{ème} jour, l'action de la colchicine s'estompe peu à peu : les mitoses reprennent de plus en plus fréquemment un aspect normal. Seules quelques cellules polyploïdes, vestiges de l'effet mitoclasique antérieur, présentent des altérations fusoriales persistantes.

Les racines soumises à l'action de l'hydroxyde de phénylmercure ne sont pas affectées par 48 heures d'immersion. Mais le 3^{ème} jour, on enregistre la présence de quelques cellules binucléées et micronoyaux, constants jusqu'à la fin de l'expérience. Aucune autre anomalie n'a pu être mise en évidence.

Les racines traitées par l'association des 2 composés acquièrent de petites tuméfactions en 48 heures alors que la croissance est fortement ralentie. Par la suite, les racines gagnent journallement 1 à 2 mm tandis que les tuméfactions semblent s'amenuiser, mais les racines se courbent en "crochets".

La mesure de la longueur moyenne des racines effectuée le 7^{ème} jour fournit les résultats suivants : témoin 95 mm ; témoin colchicine 60 mm ; témoin hydroxyde de phénylmercure 70 mm ; association 50 mm.

L'examen microscopique montre qu'en 24 heures les index mitotiques sont supérieurs à ceux des lots témoins. En même temps, l'action mitoclasique frappe 4 méristèmes tandis qu'un 5^{ème} présente un effet plus discret accompagné d'une mitodépression sensible, mais présente, au contraire, de nombreux restes de l'action mitoclasique. Dans l'ensemble des méristèmes, on constate une disproportion dans la répartition des stades mitotiques : diminution des prophases et des télophases à un moindre degré, et, surtout, accumulation de métaphases dont la moitié sont à l'état de stathmocinèse.

En 48 heures, l'action mitoclasique est plus accentuée chez les cellules polyploïdes que chez les cellules diploïdes. Les numérations révèlent que l'ensemble métaphases diploïdes et polyploïdes en stathmocinèse représentent 35 % des métaphases contre 28 % pour les cellules traitées par la colchicine seule.

Lors des prélèvements suivants, les lots témoins et les lots traités ne sont plus sensiblement différents les uns des autres.

TABLEAU n° 2

Association colchicine - hydroxyde de phénylmercure

Prélèvement	Hydroxyde de Phénylmercure seul	Colchicine seule	Colchicine + Hydroxyde de Phénylmercure
3 heures	0 et 0	1 et 0	5 et 1
24 heures	0 et 0	8 et 13	56 et 49 et 20
48 heures	0 et 0	29 et 28	36 et 35
3 jours	0 et 0	4 et 1	3 et 16 et 9

Stathmométaphases pour 100 mitoses

En résumé, ici encore, l'association de la colchicine et de l'hydroxyde de phénylmercure ne détermine un blocage fusorial qu'à la condition que la colchicine exerce un effet mitoclasique

B - COMPOSES SULFHYDRYLES

1 - Action cytologique du β mercaptoéthanol

Données bibliographiques

Une abondante littérature a trait à ce composé tant son usage s'est répandu en biologie depuis qu'il a été recommandé par OLCOTT (142). Intéressant grâce à la présence d'une fonction - SH et, de plus, d'emploi très commode, il a été utilisé dans de nombreux travaux consacrés à l'étude du rôle joué par les groupements thiols dans les processus de régénération, de morphogénèse (23) et de division cellulaire.

Effet cytologique

L'effet inhibiteur exercé par le β mercaptoéthanol sur ce dernier phénomène est rapporté par plusieurs auteurs : inhibition de la multiplication des bactéries et des levures (105), blocage de la division de Stylonychia notophora (40), de cultures synchrones d'Astasia longa (134) et de Tetrahymena (69, 133), production d'embryons jumeaux chez l'oursin (125).

D'une manière très générale, à chaque fois que la division exige l'intervention et le fonctionnement de l'appareil fusorial, elle est bloquée par le β mercaptoéthanol dont l'effet a été mis en évidence chez des cellules concréreuses souche HeLa (64, 106), chez des cellules humaines normales (106), chez les oeufs d'Echinodermes (31, 124, 131) ou d'Amphibiens (107), particulièrement favorables en raison de la synchronisation des premières segmentations et de l'ampleur du développement fusorial, et chez des cellules méristématiques de racines d'Allium Sativum (108).

De ces travaux, il ressort que l'activité antimitotique du β mercaptoéthanol est due à des troubles de l'assemblage des microtubules, à l'inhibition, réversible, de la réplication des centrosomes et à la désagrégation de l'appareil achromatique. MAZIA et ZEUTHEN (133) pensent que le blocage de la division cellulaire est le résultat de l'action du composé soufré sur les ponts disulfures, ce qui empêche la réalisation de liaisons intermoléculaires nécessaires à l'édification d'une structure protéique. Il est important de souligner que la cellule est d'autant plus sensible au β mercaptoéthanol que la division est moins avancée. En effet, l'administration de l'inhibiteur, avant la métaphase est suivie d'un effet immédiat alors qu'après la métaphase, l'effet est différé à la mitose suivante.

Enfin, le β mercaptoéthanol retarde la fusion des chromosomes en télophases et est responsable d'une légère action chromotoclasique.

Les effets particuliers de cette substance sur la mitose ont suscité de nombreux essais biochimiques car on pensait pouvoir mettre en parallèle le déséquilibre du rapport thiol-disulfure, la perturbation biochimique résultante et l'inhibition mitotique. En fait, les résultats obtenus se sont montrés assez décevants.

En ce qui concerne le métabolisme des acides nucléiques, aucun effet important n'est constaté, in vivo ou in vitro, sur l'A D N et l'A R N cellulaires du foie des Rongeurs (25) ou de l'oeuf de Batraciens (24). Pourtant, des microdosages prouvent que le β mercaptoéthanol provoque l'élévation de la teneur en A R N au cours des premiers stades de la fragmentation de l'oeuf d'Artemia salina (155). Ce résultat est confirmé par le fait que, même utilisé à des concentrations qui inhibent la régénération ou la mitose, le composé sulphydrylé stimule l'incorporation cytoplasmique de l'uridine dans les cellules de la queue de têtard (42) et de l'oeuf de Batraciens (24), alors que celle de la thymidine ne paraît pas modifiée (24). Cependant, l'influence de la durée du traitement est importante. Chez les Batraciens (24) et chez les Poulets et les Pleurodèles (146), des traitements brefs stimulent l'incorporation de thymidine, d'uridine et de cytidine alors que des traitements longs se révèlent inhibiteurs.

BRACHET et MIRAUX-JONKHEERE (27) obtiennent des résultats un peu différents. En traitant par des concentrations antimitotiques de β mercaptoéthanol des cellules intestinales ou hépatiques de souris, ils trouvent que l'incorporation de thymidine et de cytidine tritiées dans le cytoplasme est diminuée dans l'intestin alors que, dans le foie, l'incorporation de cytidine n'est pas affectée.

En résumé, il apparaît que la synthèse des acides nucléiques, même si elle est ralentie, n'est jamais complètement inhibée.

La synthèse des protéines subit également de nettes perturbations. Le β mercaptoéthanol 0,25 - 0,30 M accroît l'incorporation de la leucine par des extraits d'E. coli B dans la fraction protéique acido-insoluble (194). Mais de nombreuses expériences contredisent ce résultat. Ainsi, l'incorporation cytoplasmique de leucine tritiée par des cellules intestinales et hépatiques de souris traitées par des concentrations antimitotiques du thiol est considérablement réduite (27), alors qu'elle semble se poursuivre normalement chez l'oeuf de Batraciens (24).

Les expériences de BRACHET et coll (25), de DECROLY et coll.(41), de SCHRAM et BRACHET (168) prouvent catégoriquement que la synthèse protéique est très affectée par le β mercaptoéthanol et que l'incorporation d'acides aminés marqués in vivo et in vitro est diminuée de 30 à 50 % environ. SCHRAM et BRACHET, en outre, montrent que l'introduction de leucine et de phénylalanine dans les protéines d'un homogénat de foie est réduite de 20 à 30 % alors qu'elle est stimulée si, au lieu de l'homogénat, on utilise un système partiellement purifié composé de particules de ribonucléoprotéines mélangées au surnageant issu de la centrifugation du foie homogénéisé.

Ces résultats, en accord avec ceux que WEISSBACH (194) avait obtenus, signifient néanmoins que la plus grande prudence doit être observée dans l'interprétation des expériences variables avec les conditions expérimentales et le matériel utilisé.

Il faut encore noter que le β mercaptoéthanol n'affecte que modérément la consommation d'oxygène et pas du tout le taux d'A. T. P. ni l'activité de la cathepsine (24, 25, 41).

Enfin, en employant du β mercaptoéthanol marqué au ^{35}S , BRACHET et coll (26) montrent que la majeure partie de la radioactivité se retrouve dans des protéines basiques et dans les noyaux d'Acétabulaires et d'Amphibiens.

Résultats expérimentaux.

Le β mercaptoéthanol est une substance liquide, d'odeur forte, miscible à l'eau en toutes proportions, qui modifie légèrement, aux concentrations élevées, le pH du liquide de Knop.



$$\text{PM} = 78$$

a - Traitement continu

Les racines d'Allium ont été traitées par des solutions dont les concentrations s'étalent entre 10^{-7} mol/ml et 10^{-4} mol/ml et qui peuvent être réparties en 4 groupes :

- Les concentrations égales ou inférieures à 10^{-6} mol/ml, cytologiquement inactives.

- Les concentrations comprises entre 10^{-6} et $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml dont l'action ne s'exerce que sur la croissance.

- Les concentrations allant de 10^{-5} mol/ml à $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, létales en 48 heures ou plus et pratiquement sans effet mitoclasique.

- Les concentrations supérieures à $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, mitoclasiques, mais rapidement toxiques.

Effet des concentrations inférieures ou égales à 10^{-6} mol/ml

A ces concentrations, le β mercaptoéthanol est dénué d'effet.

L'allongement des racines est légèrement stimulé pour 10^{-7} mol/ml. Pendant toute la durée de l'expérience, les mitoses restent nombreuses et normales. Toutefois, on peut noter une diminution du nombre des télophases pour la plus forte des concentrations.

Effet des concentrations $2,5 \cdot 10^{-6}$, $5 \cdot 10^{-6}$, $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml

En général, la survie des méristèmes traités n'excède pas une semaine. Cependant, dans un cas, une racine présentait un aspect normal même après 8 jours d'immersion dans $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml. La mort se traduit par la translucidité des racines dont quelques-unes conservent néanmoins une certaine turgescence et elle survient en 5 jours pour $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml. L'aspect létal des cellules est confirmé par l'examen microscopique qui révèle des noyaux condensés, pycnosés, à nucléoles très dilatés.

C'est à partir de $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml que les premiers effets du β mercapto-éthanol s'exercent sur la croissance qui est ralentie après 24 heures de traitement et qui décroît progressivement de jour en jour. L'inhibition de l'allongement ne s'accompagne d'aucune modification morphologique caractéristique.

Pour cette gamme de concentrations, aucun symptôme important d'altération fusoriale n'est décelé même après plusieurs jours d'immersion. Seule, une réduction de l'activité mitotique se produit en 24 heures et a tendance à s'accroître les jours suivants mais elle reste cependant assez superficielle. La répartition des stades mitotiques est comparable à celle du témoin et on peut noter des anomalies peu fréquentes telles que des métaphases désorganisées et des cellules binucléées.

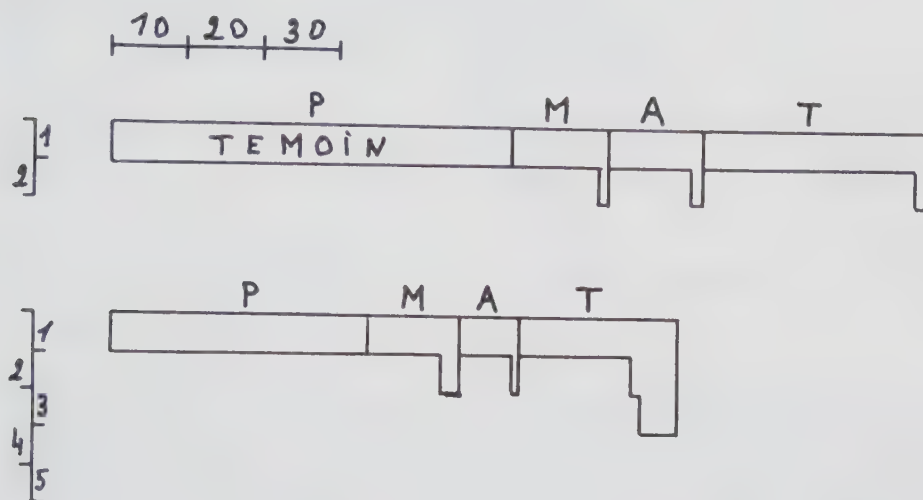
En résumé, les seuls effets produits par ces concentrations portent sur l'allongement radiculaire et l'activité mitotique. Les troubles fusoriaux restent très discrets. Enfin, la concentration $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml est la concentration-seuil létale bien que des phénomènes de résistance individuelle puissent apparaître.

Effet des concentrations 10^{-5} , $1,25 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-5}$, $2,5 \cdot 10^{-5}$, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml

Avec ces concentrations, il est impossible de mener les expériences au-delà de 4 jours, car les méristèmes traités meurent dans ce temps pour 10^{-5} mol/ml, en 3 jours pour $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/ml et en 48 heures pour $2, 2,5, 4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml.

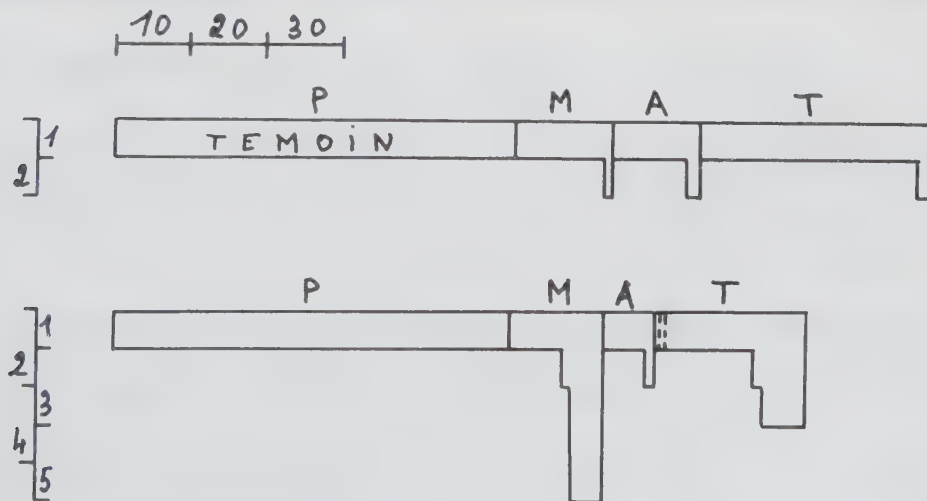
Un traitement limité à 3 heures ne s'accompagne pas, le plus souvent, des troubles mitotiques majeurs. L'ensemble des mitoses est constitué par un mélange d'images normales, de métaphases désorganisées, d'anaphases en étoile, ces dernières cependant exceptionnelles pour $1, 1,25, 2 \cdot 10^{-5}$ mol/ml. A $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, les métaphases désorganisées se font de plus en plus fréquentes et pour

la concentration supérieure, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, les premiers signes d'action mitoclasique apparaissent sous forme de stathmométaphases néanmoins peu nombreuses. En même temps, on note des prophases plus ou moins lâches que nous avons interprétées comme des prestathmométaphases et des anaphases rarement achevées. Une légère atteinte du phragmoplaste se traduit par l'apparition de quelques cellules binuclées.

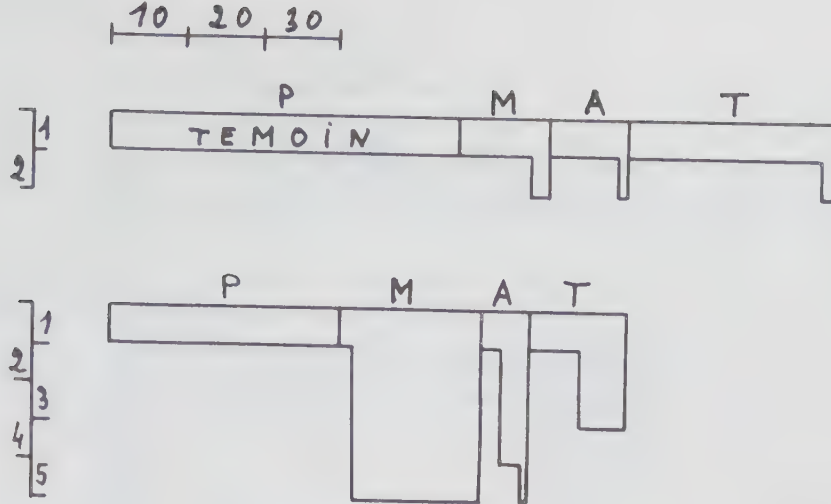


GRAPH n° 13 : Mercaptoéthanol, 10^{-5} mol/ml, 3 heures

Un séjour de 6 heures dans $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml permet le développement d'une inhibition fusoriale très étendue qui frappe métaphases, anaphases. Mais cette activité mitoclasique est toujours accompagnée d'une sévère mitodépression.



GRAPH n° 14 : Mercaptoéthanol, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 3 heures



GRAPH n° 15 : Mercaptoéthanol, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 6 heures

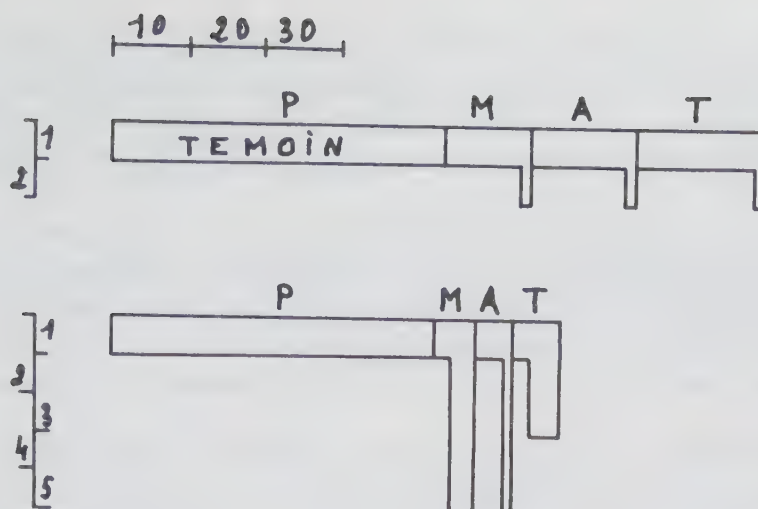
Prolongé pendant 24 heures, le traitement par ces concentrations détermine un blocage de la croissance et une réduction ou un arrêt complet de l'activité mitotique de tous les méristèmes traités. En cas de simple réduction, les cinèses qui subsistent présentent toutefois un aspect normal. Pour $2, 2, 5, 4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml des plages de noyaux condensés ou pycnosés apparaissent à l'examen microscopique.

En résumé, les caractéristiques des effets produits par ces concentrations résident essentiellement dans l'expression de l'effet mitodépresseur, très accentué en 24 heures. Puisqu'au-delà de 3 heures il est difficile de mettre en évidence une activité mitoclasique, nous pouvons considérer $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml comme la concentration seuil mitoclasique.

Effet des concentrations supérieures ou égales à $5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml

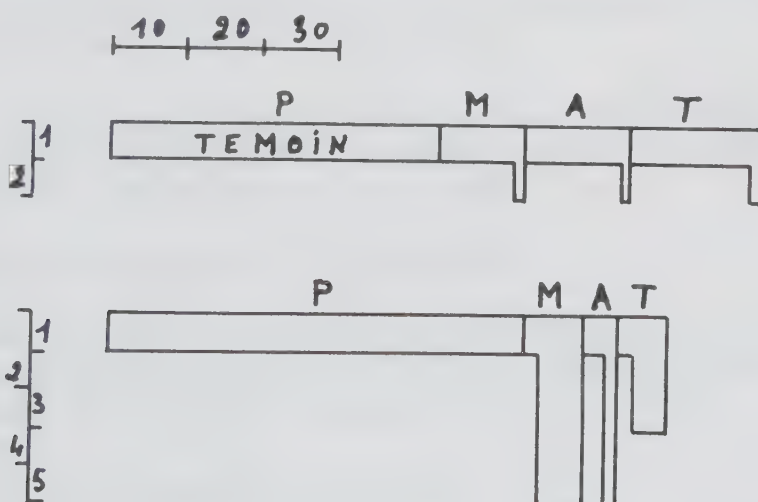
Les racines ont été traitées par $5, 6, 7, 5, 8 \cdot 10^{-5}$ mol/ml et 10^{-4} mol/ml. L'agression produite par ces concentrations est brutale puisque les cellules méristématiques ne peuvent pas séjourner plus de 24 heures dans les solutions et même, pour 10^{-4} mol/ml, les méristèmes deviennent translucides en 3 heures.

L'inhibition fusoriale est constante mais est difficilement généralisable à toutes les cinèses. Trois heures de traitement par $8 \cdot 10^{-5}$ mol/ml amènent une mitodépresseion notable par rapport aux racines témoins, de l'ordre de 20 à 30 %. Il est remarquable de constater que 70 % des cinèses sont représentées par des prophases dont plus de la moitié sont vraisemblablement sous forme de préstathmométaphases. Les métaphases dépourvues de fuseau sont assez fréquentes mais des métaphases normales ou désorganisées peuvent encore être dénombrées. Dans un méristème, nous avons compté 44 stathmométaphases, et, dans un autre, 24 pour 100 métaphases. Ce stade mitotique ne compte que pour 10 % de l'ensemble des divisions. Un mélange d'images normales, en étoile ou encore d'images inachevées forme le stade anaphasique tandis que les télophases ne possèdent, bien souvent, pas de phragmoplaste.



GRAPH n° 16 : Mercaptoéthanol, $8 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 3 heures

Pour la concentration immédiatement supérieure 10^{-4} mol/ml, les index mitotiques sont un peu plus élevés que précédemment (72,58 % et 76,88 % contre 60,13 % et 56,58 %). Les prophases représentent encore le stade le plus important, compensé par une diminution du nombre des anaphases et des télophases. 75 % environ des métaphases sont des stathmocinèses, le reste étant surtout désorganisé. Les anaphases sont lentes ou en étoile, parfois en stathmocinèses. L'inhibition des fuseaux de caryocinèse et de cytokinèse entraîne la disparition partielle ou totale du phragmoplaste se traduisant par la présence d'assez nombreuses cellules binucléées ou de cellules à phragmoplaste incomplet.



GRAPH n° 17 : Mercaptoéthanol, 10^{-4} mol/ml, 3 heures

Pour ces concentrations, un effet chromatoclasique, relativement discret, s'exerce. Des fragments de chromosomes, courts et trapus, peuvent apparaître ou bien les anaphases et télophases peuvent être pourvues de ponts d'agglutination ou de chromosomes retardataires. Quelques micronoyaux sont visibles.

En résumé, c'est à ces concentrations élevées que le β mercaptoéthanol exprime ses propriétés mitoclasiques intenses mais néanmoins incomplètes. L'inhibition fusoriale est inséparable d'un effet toxique énergétique à tel point que la dépression mitotique, caractérisant principalement les concentrations les plus basses, n'a plus le temps de s'exercer avant la mort des méristèmes pour 10^{-4} mol/ml.

Il se dégage du traitement continu qu'il est impossible d'obtenir une action mitoclasique indépendamment d'effets mitostatiques ou rapidement toxiques et l'extension de cette action à tous les stades de la mitose. C'est pourquoi nous avons essayé de développer l'inhibition fusoriale en soumettant les racines à des expositions brèves suivies de report immédiat sur milieu normal.

b - Traitement discontinu

LONGEVIALLE (108) note que l'effet mitoclasique est d'autant plus net en retour que la concentration du β mercaptoéthanol est plus élevée. Un traitement de 3 et 5 h à 10^{-4} mol/ml provoque des anomalies visibles pendant les premières heures de vie sur milieu normal, puis après une période de mitostase dont la durée varie de 24 à 48 h, des nouvelles mitoses normales réapparaissent."

L'immersion de racines dans des solutions molaires ou demi-molaires pendant 10 à 20 minutes se traduit par un effet mitoclasique, uniquement décelable en retour, qui persiste durant plusieurs jours.

Nous avons utilisé des temps de traitement de soixante minutes. Les racines ont été plongées dans des solutions de concentration 7, 5, 5, 2, 5 et 10^{-4} mol/ml puis elles ont été replacées sur milieu normal.

Effet de la concentration 7, 5. 10^{-4} mol/ml

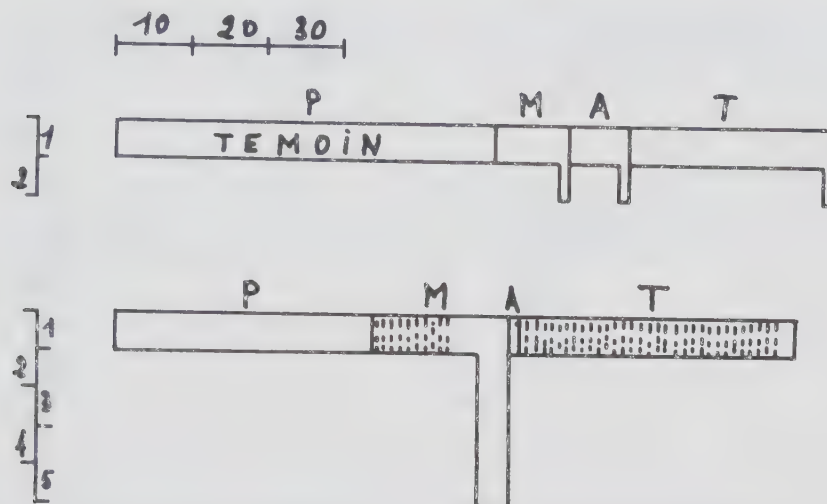
Au bout d'une heure, toutes les mitoses sont fixées. Les noyaux quiescents ont un aspect létal très prononcé. Les racines deviennent flaccides et translucides durant le "retour" sur liquide de Knop.

Effet de la concentration 5. 10^{-4} mol/ml

L'examen microscopique des cellules qui ont séjourné 1 heure dans cette solution révèle de nombreuses agglutinations, des télophases principalement. Les

noyaux au repos sont coagulés. Les index mitotiques sont très peu inférieurs aux témoins. La répartition des mitoses est anormale : on note une accumulation des métaphases et de télophases compensée par une très nette diminution des prophases et surtout des anaphases.

Au point de vue cytologique, quelques métaphases sont bloquées en stathmocinèses et quelques télophases sont dépourvues de phragmoplaste. On note enfin des ponts d'agglutination anaphasiques et télophasiques.



GRAPH n° 18 : Mercaptoéthanol $5 \cdot 10^{-4}$ mol/ml, 1 h Traitement

Dans les prélèvements de 1 heure, 2 heures, 3 heures et 4 heures "retour", on enregistre un abaissement léger mais constant de l'index mitotique qui a des valeurs de 79, 15 ‰ et 82, 18 ‰ après 4 heures.

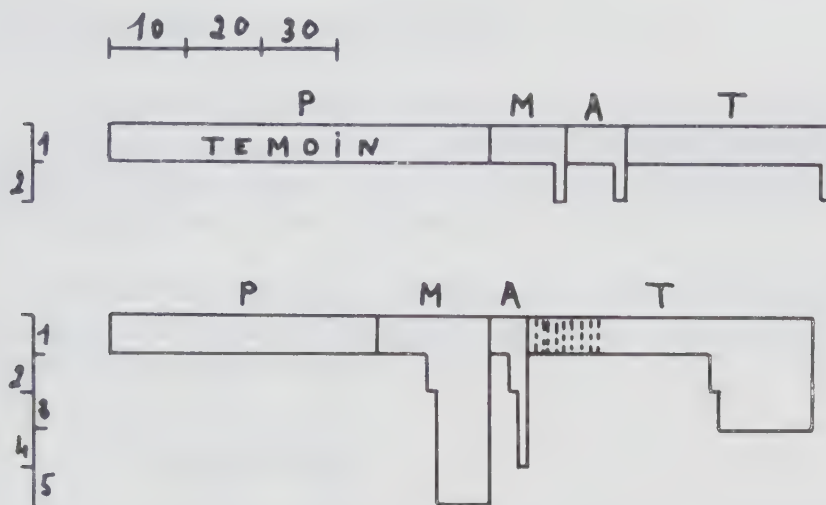
Les prophases se maintiennent toujours vers 38 % sauf en 4 heures où leur proportion diminue encore jusqu'à 29 %. Ce taux constant des prophases indique leur blocage.

Les métaphases, toujours nombreuses, subissent une inhibition fusoriale qui reste néanmoins partielle. Au fur et à mesure des prélèvements, les métaphases sont de plus en plus agglutinées.

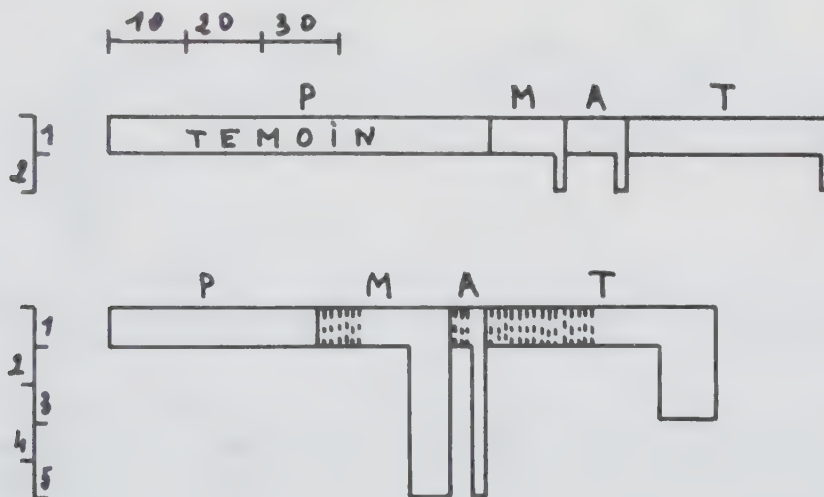
Les anaphases, en nette disparition, sont le plus souvent agglutinées et pourvues de ponts d'agglutination.

Enfin, les télophases, qui constituent l'élément le plus nombreux parmi les cinèses, sont soit normales soit sans phragmoplaste. Beaucoup sont agglutinées et quelques unes possèdent des ponts chromosomiques.

Les noyaux quiescents pycnosés sont de plus en plus abondants au fil des prélèvements.



GRAPH n° 19 : Mercaptoéthanol $5 \cdot 10^{-4}$ mol/ml, 2 h retour



GRAPH n° 20 : Mercaptoéthanol $5 \cdot 10^{-4}$ mol/ml 4 h Retour

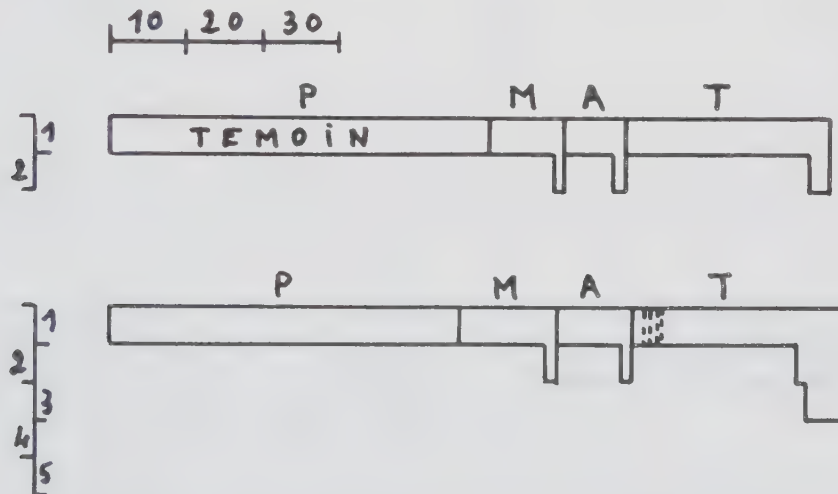
24 heures après la mise en retour, tous les méristèmes sont flaccides et la cytologie correspond à la mort.

En somme, l'action du β mercaptoéthanol s'est manifestée par un blocage immédiat des mitoses en cours. Même sur milieu normal, l'évolution vers le mort s'est faite de manière irrémédiable.

Effet de la concentration $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol/ml

A l'issue d'une heure de traitement, il y a beaucoup moins de mitoses agglutinées que pour la concentration précédente. Seules, quelques télophases représentant environ 5 % des mitoses apparaissent fixées. Les index mitotiques sont sensiblement équivalents à ceux des témoins.

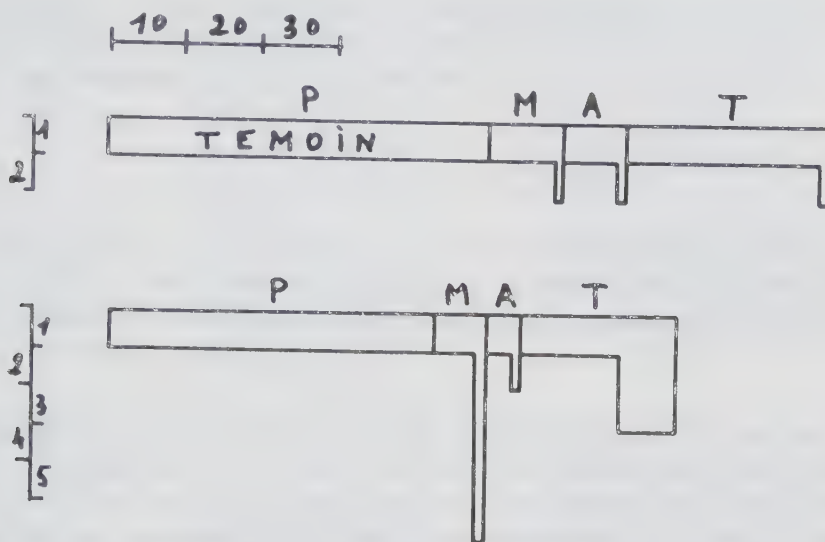
La répartition des stades mitotiques est très peu affectée à l'exception d'un pourcentage d'anaphases légèrement modifié et, au point de vue cytologique, le fuseau semble fonctionner normalement.



GRAPH n° 21 : Mercaptoéthanol $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol/ml, 1 h Traitement

Après une heure de "retour" on assiste à une nette régression des métaphases et des anaphases dont l'ensemble représente 15 % environ des mitoses. L'inhibition fusoriale, absente chez les métaphases et les télophases, s'exprime au niveau des télophases qui sont souvent dépourvues de phragmoplaste. Quelques ponts d'agglutination témoignent de l'activité chromatoclasique de ce composé.

Après un séjour de 2 heures sur liquide de Knop, les effets observés après 1 heure s'accroissent. Les index mitotiques ne cessent de s'abaisser. Prophases et télophases constituent 90 % des mitoses mais les stathmocinèses restent exceptionnelles, les signes d'action mitoclasique étant surtout visibles, ici encore, sous forme de télophases sans phragmoplaste.



GRAPH n° 22 : Mercaptoéthanol, $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol/ml, 2 h Retour

En 3 heures, l'aspect cytologique est le même mis à part les index mitotiques en diminution qui, une heure plus tard, sont de 51,54 ‰ et 68,29 ‰. En même temps, la proportion de prophases s'abaisse. Les symptômes d'altération fusoriale demeurent toujours aussi rares.

Après 24 heures de retour, les racines ont un aspect normal ainsi que les noyaux. Les numérations effectuées ne donnent aucune mitose sur un méristème tandis que l'autre ne renferme qu'une prophase et une télophase. Les cellules binucléées résultant de l'inhibition du fuseau de cytokinèse sont assez fréquentes.

En résumé, cette durée de traitement est compatible avec la survie des méristèmes mais ne donne pas lieu à une activité mitoclasique.

Effet de la concentration 10^{-4} mol/ml.

Dans cette expérience, les mitoses ne sont altérées ni après le traitement, ni après la mise "en retour". Cependant, un effet mitodépresseur s'installe après 2 heures de retour, s'accroît ensuite mais disparaît complètement après 24 heures.

En somme, les expériences de "retour" ne sont pas plus favorables au développement de l'effet mitoclasique que les expériences en continu car on ne peut pas séparer effet toxique et effet mitoclasique.

Conclusion

Dénué d'effet à 10^{-6} mol/ml, le β mercaptoéthanol exerce une action létale à partir de $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, qui s'accompagne d'une dépression mitotique de plus en plus précoce consécutive à une inhibition prophasique comme en témoigne la nette augmentation de ce stade.

L'altération de l'appareil fusorial apparaît pour des concentrations supérieures ou égales à $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml mais ne s'étend jamais à l'ensemble des mitoses que ce soit en traitement continu ou en traitement par retour. En raison de la mitodépression, toujours forte pour ces concentrations, les actions mitoclasiques les plus franches ne s'exercent pas au-delà de 3 ou 6 heures.

Les traitements discontinus sont plus favorables à l'observation d'une atteinte de la chromatine alors qu'en continu le pourcentage des micronoyaux et de fragmentation est toujours faible.

ANTAGONISME MERCAPTOETHANOL - COLCHICINE

Nous avons utilisé la concentration $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml de β mercaptoéthanol qui, employée seule, n'est pas mitoclasique mais seulement mitodépressive après 48 heures.

Un prélèvement de contrôle effectué après 24 heures de séjour soit sur liquide de Knop soit sur la solution de β mercaptoéthanol indique que, d'un côté comme de l'autre, l'état cytologique des méristèmes est satisfaisant.

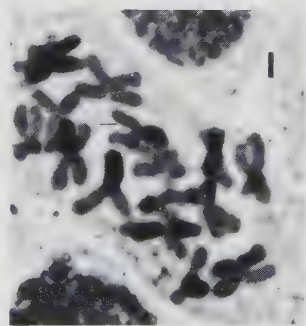
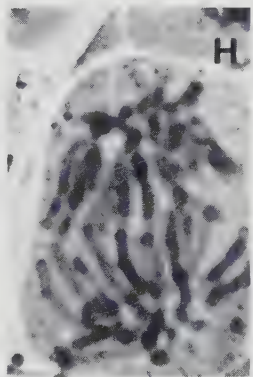
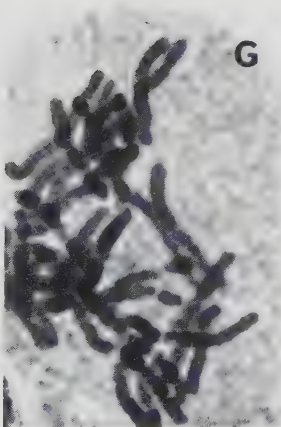
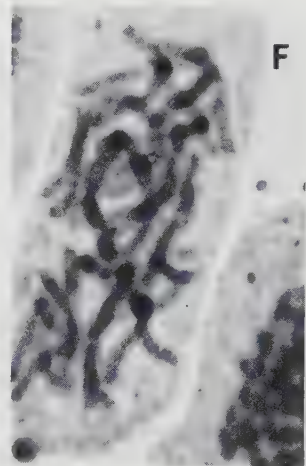
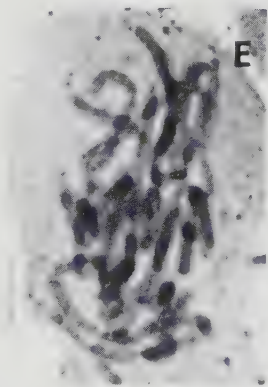
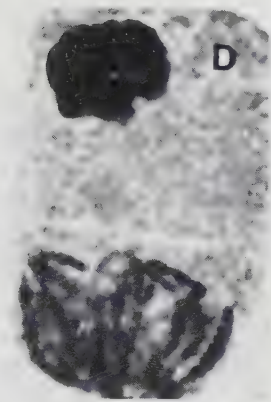
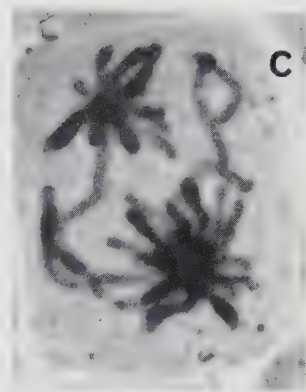
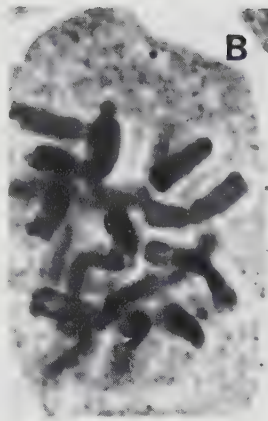
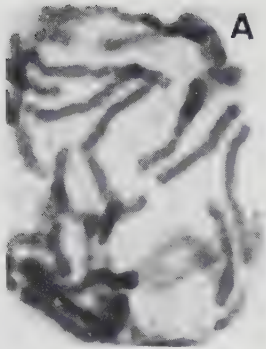


PLANCHE 3

- Photos A, D et G : action du N-éthylmaléimide, 5.10^{-7} mol/ml, 10 mn' de traitement, 4 h retour : stathmométaphase (A), télophase avec pôle agglutiné (D), stathmoanaphase (G).
- Photo B : action du β mercaptoéthanol, 4.10^{-5} mol/ml, 6 heures : stathmométaphase.
- Photo C : action de l'hydroxyde de phénylmercure, $2,5.10^{-9}$ mol/ml, 24 heures : hémianaphase.
- Photos E et H : action de l'hydroxyde de phénylmercure, $2,5.10^{-9}$ mol/ml, 48 heures : anaphases "lentes".
- Photo F : action de l'hydroxyde de phénylmercure, $2,5.10^{-9}$ mol/ml, 24 heures : stathmométaphase.
- Photo I : action de l'hydroxyde de phénylmercure, 10^{-8} mol/ml, 1 heure traitement, 24 heures retour : stathmométaphase avec des chromosomes dispersés et contractés.
-

Après une heure d'immersion dans la colchicine, l'index mitotique s'élève sensiblement. On note déjà une accumulation de métaphases dont près de la moitié sont désorganisées. Les altérations du fuseau sont très discrètes. Le bulbe soumis au traitement préalable par le mercaptoéthanol revêt le même aspect cytologique que le témoin colchicine mais les index mitotiques sont abaissés de 25 % environ, ce qui correspond d'ailleurs à l'abaissement enregistré dans le bulbe "mercaptoéthanol" dans lequel, cependant, on ne remarque aucune anomalie marquante.

Après 2 heures de retour, l'effet de la colchicine s'intensifie. Dans le témoin correspondant, les index mitotiques sont respectivement de 131,71 et 135,27 ‰. On relève environ 34 % des mitoses en métaphases parmi lesquelles 55 % sont en stathmocinèses. L'action mitoclasique gagne les phases ultérieures et on enregistre des stathmo- et hémiana- et télophases. Par contre, elle est beaucoup plus réduite dans le bulbe "antagonisme". En effet, seulement 7 % des métaphases sont bloquées en stathmocinèses. L'accumulation de ce stade est également moins prononcée. Mais, en même temps, la dépression mitotique gagne en profondeur à la fois dans le bulbe "antagoniste" et dans le témoin "mercaptoéthanol" où les seules altérations consistent en métaphases désorganisées et en télophases sans phragmoplaste.

TABLEAU N° 3

Antagonisme mercaptoéthanol $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml
colchicine

Prélèvement	Témoin Colchicine	Témoin Mercaptoéthanol	Antagonisme
1 h T	4,69 et 4,69	0 et 0	5,08 et 4,92
2 h R	57,55 et 52,83	1,54 (très et désorg) 0	6,89 et 7,94
3 h R	62,64 et 69,51	2,13 (très - désorg)	10,30 et 7,94
4 h R	23,73 et 16,39	3,64 et 1,72	1,78 et 3,33

Stathmométaphases pour 100 métaphases

Après 3 heures de retour, l'action mitoclasique s'exerce encore facilement dans le témoin colchicine et s'étend aux anaphases et télophases si bien que nous n'avons dénombré que 16,33 et 13,26 % de mitoses normales dans 2 méristèmes. Les index avoisinent encore 130 ‰. L'activité mitotique du bulbe "antagoniste" est réduite de 50 % environ. Les mitoses conservent le plus souvent une structure fusoriale normale : les stathmométaphases ne sont pas abondantes. De la même façon, les numérations effectuées sur les racines plongées dans le mercaptoéthanol témoignent d'une dépression mitotique.

TABLEAU N° 4

Antagonisme mercaptoéthanol 2,5. 10⁻⁶ mol/ml
Colchicine

Prélèvement	Témoin Colchicine	Témoin Mercaptoéthanol	Antagonisme
1 h T	58,93 et 58,93	66,43 et 67,33	50,00 et 66,24
2 h R	18,71 et 18,03	74,28 et 77,48	65,84 et 60,87
3 h R	16,33 et 13,26	57,93 -	60,37 et 58,46
4 h R	44,85 et 53,09	74,54 et 74,14	72,66 et 73,24

Mitoses normales pour 100 mitoses

Enfin, à la 4ème heure, le retour à la normale des cinèses se fait dans le témoin colchicine et aussi dans l'essai d'antagonisme mais beaucoup plus rapidement dans le premier que dans le second. En effet 20 % des métaphases sont en stathmo-cinèses dans le lot colchicine contre 2 à 3 % pour l'essai d'antagonisme. Les restes de l'action mitoclasique, visibles dans les racines soumises à la colchicine, sont pratiquement inexistantes lorsque le mercaptoéthanol est administré en traitement préalable mais s'accompagnent alors d'une mitodépression sévère.

En 24 heures, les séquelles de l'inhibition fusoriale, sous forme de cellules polyploïdes, de stathmodiérèses dans le témoin colchicine, sont absents du bulbe "antagonisme".

En résumé, l'action mitoclasique de la colchicine peut être contrariée par le composé sulfhydrylé au prix d'une mitodépression assez forte. La protection n'est certes pas totale mais elle s'exerce cependant d'une manière efficace surtout lorsque l'alcaloïde est très mitoclasique.

Nous avons voulu reproduire cette expérience en essayant de limiter au maximum l'effet mitodépresseur. Nous avons, dans cette intention, employé une concentration de $1,25 \cdot 10^{-6}$ mol/ml en mercaptoéthanol et, pour éviter l'autooxydation possible de ce produit, nous avons renouvelé les solutions 2 fois en 24 heures à intervalle régulier.

Après 1 heure de traitement par l'alcaloïde, l'examen microscopique révèle d'emblée une activité mitoclasique intense puisque 60 % environ des métaphases sont à l'état de stathmocinèses dans le témoin colchicine. Le traitement préalable par le mercaptoéthanol fait tomber ce taux à 30 %.

TABLEAU N° 5

Antagonisme mercaptoéthanol $1,25 \cdot 10^{-6}$ mol/ml
Colchicine

Prélèvement	Témoin Colchicine	Témoin Mercaptoéthanol	Antagonisme
1 h T	60, 53 et 57, 57	0 et 0	30, 91 et 36, 36
2 h R	80, 53 et 77, 88	0 et 0	63, 16 et 61, 11
3 h R	69, 72 et 62, 96	0 et 0	62, 96 et 65, 79
4 h R	60, 97 et 74, 36	0 et 0	53, 48 et 36, 00

Stathmométaphases pour 100 métaphases

Lors des prélèvements ultérieurs, la proportion d'anomalies fusoriales est légèrement plus élevée dans le lot "colchicine" que dans le bulbe "antagonisme" sans pour cela mettre nettement en évidence une action protectrice du composé sulfhydrilé vis-à-vis de l'alcaloïde.

Après un retour de 4 heures, le retour à la normale des mitoses se fait plus rapidement dans l'antagonisme que dans le témoin "mitoclasique" : 36 % de stathmométaphases contre 70 % dans le lot "colchicine".

TABLEAU N° 6

Antagonisme mercaptoéthanol 1, 25. 10⁻⁶ mol/ml
Colchicine

Prélèvement	Témoin Colchicine	Témoin Mercaptoéthanol	Antagonisme
1 h T	31, 14 et 37, 85	100 et 100	50, 10 et 45, 22
2 h R	13, 30 et 12, 02	100 et 100	20, 99 et 27, 33
3 h R	13, 04 et 8, 61	100 et 100	22, 45 et 26, 45
4 h R	14, 06 et 11, 67	100 et 100	22, 22 et 31, 07

Mitoses normales pour 100 mitoses
(prophases non comprises)

En d'autres termes, nous n'avons pas pu mettre en évidence, dans cette expérience, une protection exercée par le mercaptoéthanol vis-à-vis de la colchicine mais seulement un léger retard à l'effet mitoclasique et un retour un peu plus rapide à la normale.

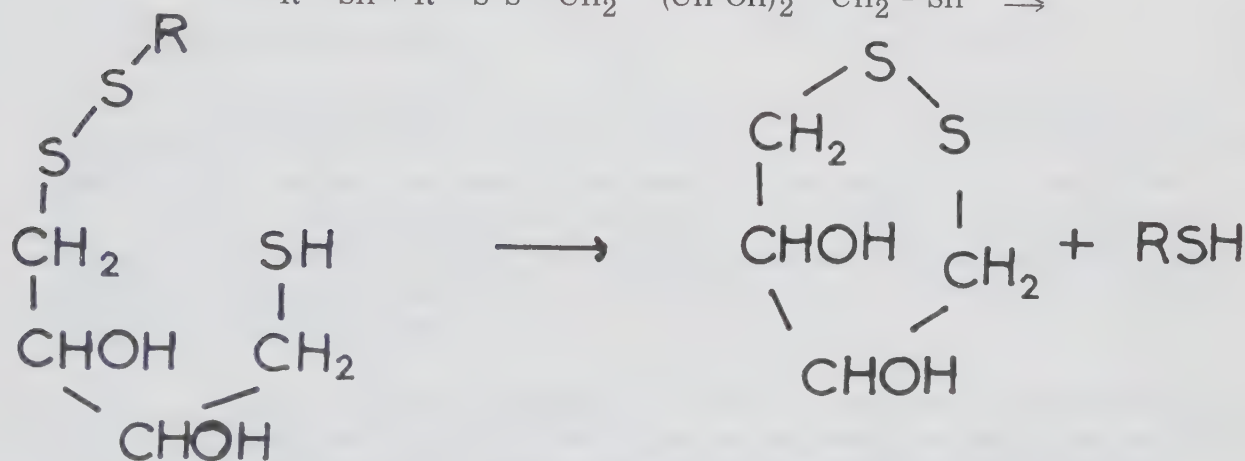
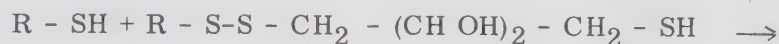
2 - Action cytologique du Dithioérythritol

Données bibliographiques

A notre connaissance, il n'existe aucune donnée expérimentale se rapportant à l'effet cytologique de ce composé. Les seuls renseignements que nous possédons concernent ses propriétés biochimiques.

L'emploi du dithioérythritol, isomère érythro-du dithiothreitol, a été préconisé par CLELAND (35) en raison de sa solubilité élevée dans l'eau et de sa faible tendance à l'autooxydation. En outre, son potentiel d'oxydoréduction très bas lui permet de maintenir les thiols à l'état réduit et de réduire complètement les liaisons disulfures.

D'après CLELAND, la réaction d'un disulfure avec le dithioérythritol est du type : $R-S-S-R + HS-CH_2-(CH\ OH)_2-CH_2-SH \rightleftharpoons$



Divers auteurs ont mis à profit les propriétés si particulières du dithioérythritol ou de son isomère thréo, le dithiothreitol, entre lesquels les différences sont minimales : SAKAI (161), pour scinder la fraction protéique 3, 5 S en 2, 5 S, s'est adressé à sa faculté de rompre les ponts disulfures ; TAMAOKI et MIYAZAWA (183), WALKER (190), WALKER et SMITH (191), pour protéger les groupements - SH qui sont alors maintenus à l'état réduit contre l'action de substances thiolooprives ou radiomimétiques.

C'est également pour ces propriétés que nous avons pensé à utiliser le dithioérythritol sur les cellules d'Allium. Les méristèmes radiculaires ont été traités par des solutions de concentrations croissantes de $5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml à 10^{-4} mol/ml.

Résultats expérimentaux

Formule : $\text{HS CH}_2 - \text{CH OH} - \text{CH OH} - \text{CH}_2 \text{SH}$ PM = 154

C'est un composé pulvérulent, d'odeur forte, très soluble dans l'eau, qui n'entraîne pas de modification de pH du liquide de Knop même à hautes concentrations.

a - Traitement continu

Nous verrons les concentrations allant de $5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml à 10^{-6} mol/ml, les concentrations $2,5$ et $5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, la concentration $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, la concentration 10^{-5} mol/ml, les concentrations $2,5$, 5 , $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml et la concentration 10^{-4} mol/ml. Il est difficile, en effet, de grouper plusieurs concentrations, chacune exerçant un effet légèrement différent.

Effet des concentrations $5 \cdot 10^{-8}$; 10^{-7} ; $5 \cdot 10^{-7}$; 10^{-6} mol/ml.

Quand les solutions sont laissées au contact des racines pendant toute la durée de l'expérience, la croissance radiculaire, légèrement ralentie en 24 heures pour $5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml, est plus profondément altérée pour $5 \cdot 10^{-7}$ mol/ml et 10^{-6} mol/ml, concentrations pour lesquelles elle est faible ou nulle à partir du 4ème jour. Au bout de 7 jours, des longueurs moyennes de racines traitées sont inférieures d'un tiers pour 10^{-6} mol/ml et de la moitié pour $5 \cdot 10^{-7}$ mol/ml par rapport aux racines témoins.

Suivant les bulbes exposés à 10^{-6} mol/ml, quelques racines peuvent devenir translucides et présenter des signes de chromatolyse tandis que les autres conservent un aspect cytologique pratiquement normal mais portent alors des épaississements sus-méristématiques.

L'activité mitotique, normale pour les concentrations inférieures, est profondément réduite en 48 heures pour 10^{-6} mol/ml. La période de mitostase s'étend jusqu'au 5ème jour, après quoi les mitoses redeviennent normales.

En aucun cas, nous n'avons relevé d'anomalie de la mitose.

Devant ce résultat inattendu, obtenu pour 10^{-6} mol/ml, nous avons répété les essais en prenant la précaution de renouveler journallement les solutions.

La concentration $5 \cdot 10^{-7}$ mol/ml, inactive précédemment, détermine une mitodépression en 3 jours qui va en s'accroissant les jours suivants et qui est accompagnée d'un ralentissement de la croissance radiculaire qui débute en 24 heures. Le 7ème jour, l'aspect cellulaire correspond à la mort.

Les différences sont encore plus frappantes pour 10^{-6} mol/ml car la croissance est définitivement arrêtée en 48 heures, la mitostase est totale dans le même temps. Le 4ème jour, la cytologie est très altérée. Les noyaux sont condensés.

En résumé, le dithioérythritol, laissé au contact des racines, perd une partie de son activité, peut-être par autooxydation. Les effets produits par ces concentrations ne s'exercent que sur la croissance et la survie des cellules.

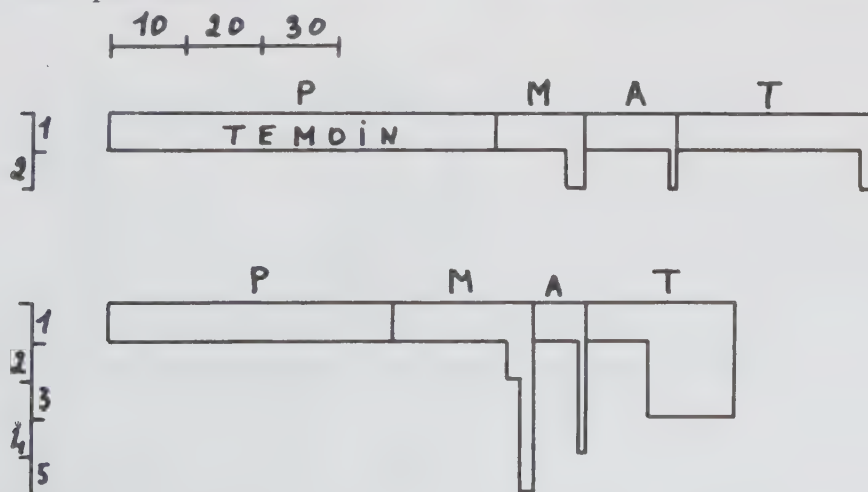
Effet des concentrations 2, 5 et $5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml

A partir de ces concentrations, nous n'avons plus renouvelé les solutions car les phénomènes de toxicité apparaissent toujours rapidement. En effet, la mort survient en 3 jours pour $2, 5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml et en 48 heures pour $5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml.

Un traitement de 3 heures n'a que des effets discrets. Très peu affectée par $2, 5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, l'activité mitotique subit cependant un abaissement de 20 % environ pour la concentration supérieure. La répartition des mitoses est sensiblement identique à celle des racines témoins, excepté pour un méristème soumis à $5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml pour lequel on note une diminution appréciable du pourcentage d'anaphases.

Au point de vue cytologique, 4 % environ des prophases ont tendance à retourner à l'état interphasique. Les métaphases, dont la fréquence est légèrement supérieure à la normale, sont le plus souvent inaltérées ou bien légèrement désorganisées. Cependant, quelques-unes, très rares, sont bloquées en stathmocinèses. Les anaphases sont normales, parfois en hémicinèses. En revanche, la moitié des télophases sont privées de phragmoplaste.

Quelques images présentent des chromosomes denses et très contractés. Des ponts anaphasiques, exceptionnels, témoignent cependant d'une activité chromotoclasique discrète.



GRAPH n° 23 : Dithioérythritol, $5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, 3 heures

En 24 heures, la croissance radiculaire est nulle et l'effet mitodépresseur total. Seules, quelques cellules binucléées rappellent l'inhibition phragmoplastique antérieure. Certains noyaux, avec des nucléoles dilatés, ont un aspect létal.

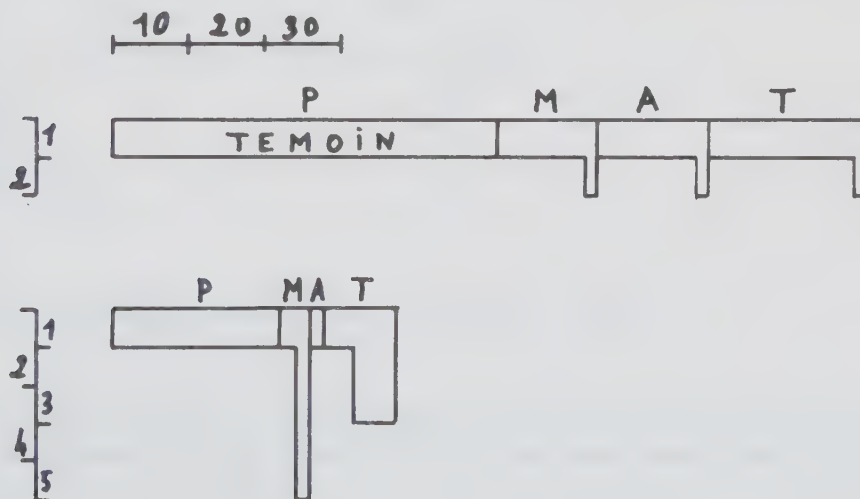
En résumé, ces concentrations sont essentiellement mitodépresseuses et toxiques. 5.10^{-6} mol/ml provoque l'apparition des premiers signes d'activité mitoclasique et chromotoclasique et peut être considérée comme la concentration seuil.

Effet de la concentration $7,5.10^{-6}$ mol/ml

Un séjour de 3 heures est responsable d'une chute de l'index mitotique évaluée à 60 % environ par rapport aux index témoins (42,14 ‰ et 37,04 ‰ contre 101,42 ‰ et 102,14 ‰). Les numérations totales donnent 409 mitoses pour un méristème et 313 pour le second.

Par rapport aux autres stades, on note une proportion anormalement élevée de prophases qui représentent 60 % environ des mitoses totales. Parmi elles plus de la moitié retournent en interphase.

L'ensemble des métaphases et des anaphases, évalué à 10 % des mitoses, contrebalance l'augmentation prophasique. Les métaphases sont soit désorganisées soit bloquées en stathmocinèses. Les anaphases demeurent le plus souvent normales. De nombreuses télophases sont dépourvues de phragmoplaste et vont donner des cellules binucléées, déjà fréquentes. Les chromosomes sont très souvent contractés.



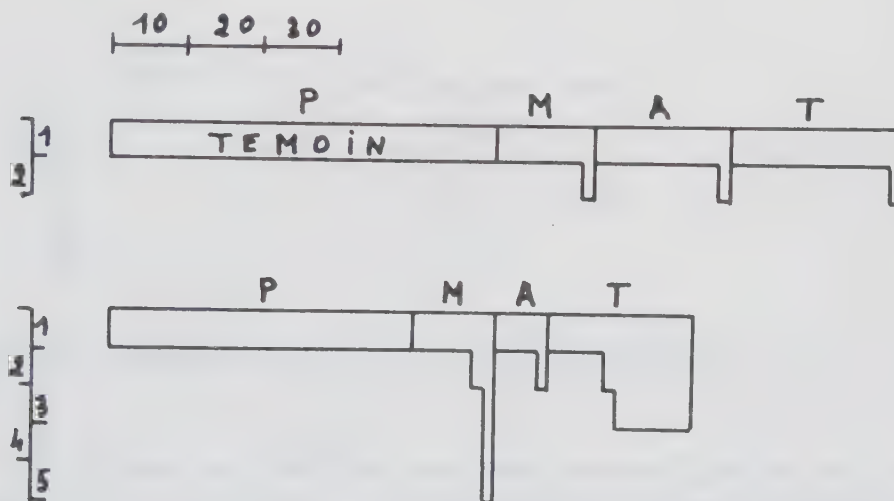
GRAPH n° 24 : Dithioérythritol, $7,5.10^{-6}$ mol/ml, 3 heures

En 24 heures, la croissance est bloquée, Les mitoses ont complètement disparu. Les noyaux quiescents sont condensés et granuleux. De toute façon, la mort est irréversible après 48 heures.

En résumé, cette concentration produit les mêmes actions que les précédentes mais en diffère par l'accumulation des prophases, signe de blocage de la mitose à ce niveau et par la nette régression des métaphases et anaphases.

Effet de la concentration 10^{-5} mol/ml

Après 3 heures d'immersion les index mitotiques chutent environ de 20 %. L'examen microscopique révèle une réduction sensible du nombre des anaphases avec une augmentation légère des télophases. L'inhibition fusoriale n'affecte que le cinquième des métaphases. Cinquante pour cent sont désorganisées et 30 % rigoureusement normales. C'est là le seul indice d'activité mitoclasique car les anaphases ainsi que les télophases sont pourvues d'un fuseau fonctionnel. Le phragmoplaste n'apparaît pas dans 50 % des télophases.



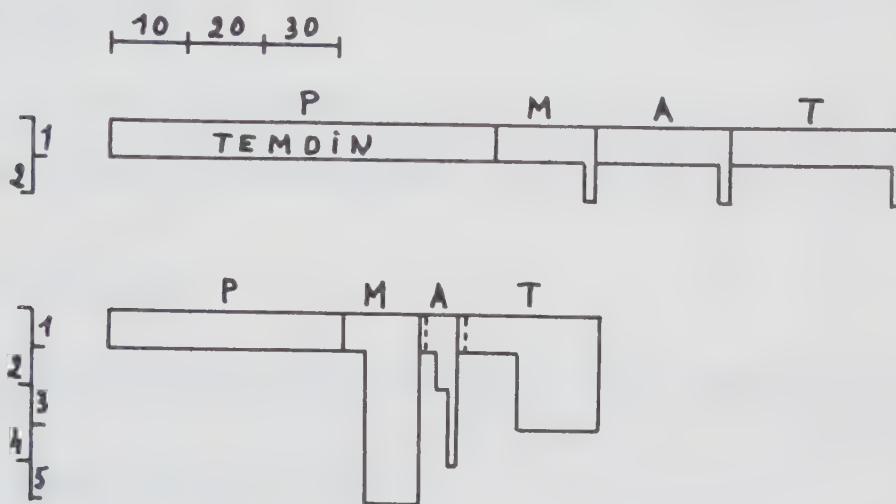
GRAPH n° 25 : Dithioérythritol, 10^{-5} mol/ml, 3 heures

Si le traitement est prolongé jusqu'à 6 heures, l'activité mitotique diminue encore (index de 64, 07 et 64, 88 ‰). Les métaphases sont souvent frappées par la disparition des fibres fusoriales ; les images normales sont exceptionnelles. Les chromosomes métaphasiques sont parfois contractés.

Le stade anaphasique, en voie de disparition, est constitué par un mélange de mitoses normales, lentes ou en hémicinèses.

Le phragmoplaste n'existe pas chez 60 % des télophases tandis que les cellules binucléées augmentent notablement.

Parallèlement à l'inhibition fusoriale, un léger effet chromotoclasique s'exerce et se traduit par des ponts anaphasiques et télophasiques qui sont malgré tout peu abondants. En même temps, des noyaux morts apparaissent et c'est après 24 heures que la mort se produit. Les méristèmes sont alors mous et ont une odeur fortement alliagée.



GRAPH n° 26 : Dithioérythritol, 10^{-5} mol/ml, 6 heures

En résumé, une inhibition fusoriale débute en 3 heures mais se généralise en 6 heures. Elle s'accompagne d'un effet mitodépresseur et est indissociable d'une action létale.

Effet des concentrations 2,5 ; 5 ; 7,5. 10^{-5} mol/ml

A ces concentrations, l'intoxication par le dithioérythritol est brutale.

Les racines traitées montrent en 3 heures une mitodépresseur paradoxale-ment plus accentuée pour $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml que pour les autres concentrations. Les mitoses en cours subissent une inhibition fusoriale partielle ou totale qui se manifeste par des stathmométaphases, des anaphases en étoile, des télophases sans phragmoplaste et des cellules binucléées. Les exemples d'agglutination, de pycnose nucléaire et de dilatation nucléaire sont fréquents.

Après 6 heures, les divisions cessent totalement et parallèlement, l'aspect léthal gagne peu à peu toutes les régions du méristème.

En 24 heures, les méristèmes sont mous et translucides.

En somme, en un temps très court, ces concentrations exercent simultanément les effets mitoclasique, mitodépresseur et mortel.

Effet de la concentration 10^{-4} mol/ml

On assiste, ici, à une véritable sidération des cellules qui donnent déjà des signes de mort après 3 heures d'immersion. L'examen cytologique révèle alors des mitoses nombreuses et normales. Les cas d'altération sont rares. Les télophases sont cependant agglutinées.

L'interruption du traitement suivi de report sur milieu normal ne permet pas la reprise de la croissance. Un prélèvement effectué après 3 heures de "retour" montre que les noyaux pycnosés envahissent progressivement les méristèmes.

b - Traitement discontinu

Nous avons soumis les racines d'Allium à des traitements de 1 heure pour 10^{-4} mol/ml et 7,5. 10^{-5} mol/ml et de 2 heures pour 7,5. 10^{-5} mol/ml.

Effet de la concentration 10^{-4} mol/ml

Après 1 heure de traitement, rares sont les anomalies. Les prophases sont nombreuses, les métaphases plus ou moins retardées, les anaphases parfois en étoile et les télophases normales ou sans phragmoplaste, parfois agglutinées. On relève encore quelques cellules binucléées.

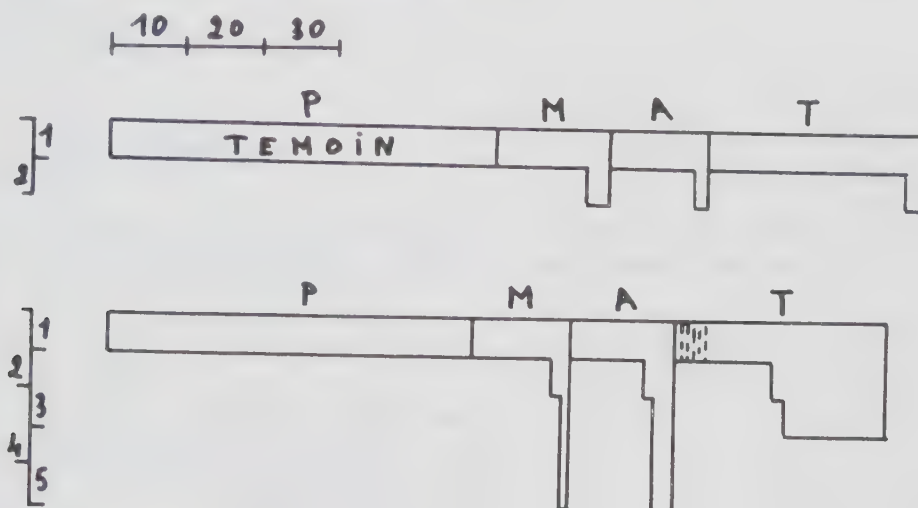
Après 2 heures de vie sur milieu normal, les racines deviennent translucides mais, au microscope, elles ne présentent aucune altération correspondant à la mort. Les mitoses sont normales, à l'exception de quelques stathmométaphases.

Dans les prélèvements ultérieurs effectués d'heure en heure, les divisions se raréfient progressivement et ont pratiquement disparu en 5 heures.

L'activité mitotique reprend en 24 heures, sauf pour un méristème où la mitodépresseur est encore profonde. Les mitoses sont alors normales. Cependant, la croissance radiculaire n'est pas totalement rétablie.

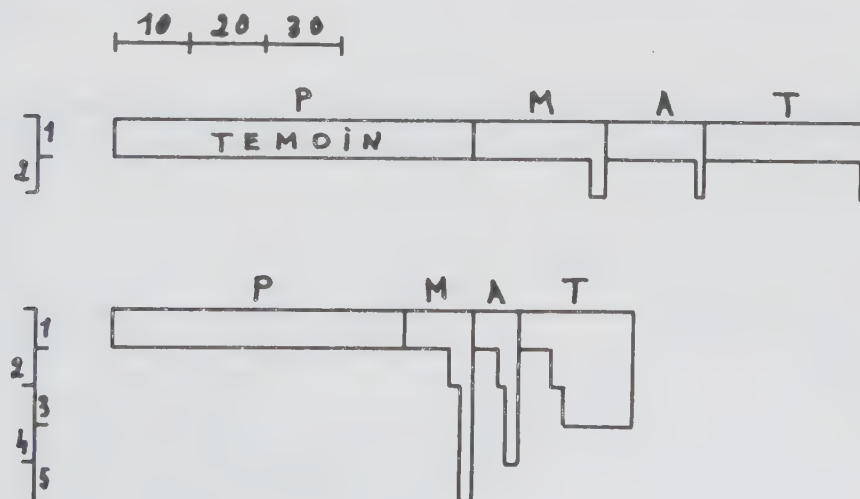
Effet de la concentration $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml

A l'issue d'un traitement d'une heure, l'activité mitotique n'est pratiquement pas modifiée. On note une légère diminution des métaphases, intactes ou désorganisées mais rarement en stathmocinèses. Parmi les anaphases, on rencontre des images bloquées, des images en étoile ou bien des anaphases à chromosomes retardataires. Les télophases sont agglutinées et normales ou dépourvues de phragmoplaste pour la majorité d'entre elles.



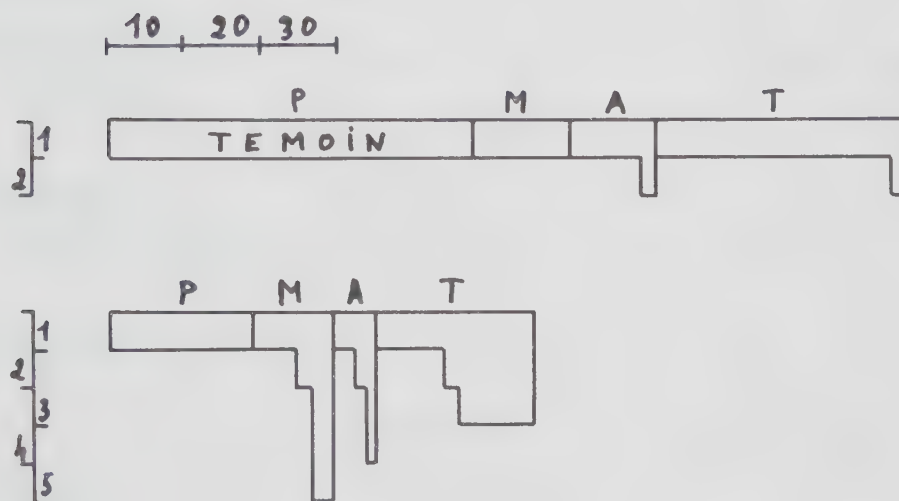
GRAPH n° 27 : Dithioérythritol, $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 1 heure

Après un "retour" de 2 heures, la moitié des racines sont translucides mais turgescentes. L'index mitotique accuse une baisse sensible, 30 % environ. L'activité mitoclasique n'est pas franche et ne s'exerce que sur une faible proportion de métaphases et d'anaphases. Les télophases sans phragmoplaste représentent plus de la moitié des télophases.



GRAPH n° 28 : Dithioérythritol $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 2 h Retour

Après un séjour de 3 heures sur liquide de Knop, les index mitotiques sont aux environs de 50 ‰. Les prophases et anaphases disparaissent peu à peu tandis que métaphases et télophases augmentent. On relève la présence de prophases en régression et de quelques stathmométaphases et hémianaphases.



GRAPH n° 29 : Dithioérythritol $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 3 h Retour

Des numérations totales effectuées sur deux méristèmes immergés pendant 4 heures dans le liquide de Knop donnent les résultats suivants :

	<u>Méristème I</u>		<u>Méristème 2</u>	
Nombre total de cinèses	506		580	
Prophases normales	197	soit 38,93 %	185	soit 31,90 %
" en régression	48	" 9,49 %	39	" 6,72 %
Métaphases normales	16	soit 3,17 %	19	soit 3,28 %
" désorganisées	41	" 8,10 %	50	" 8,62 %
Stathmométaphases	24	" 4,74 %	32	" 4,14 %
Anaphases normales	15	soit 2,97 %	26	soit 4,48 %
" "lentes"	24	" 4,74 %	31	" 5,34 %
" en étoile	3	" 0,59 %	9	" 1,55 %
Télophases normales	64	soit 12,65 %	83	soit 14,31 %
" sans phragmo.	74	" 14,62 %	106	" 18,18 %

Après un "retour" de 5 heures

	<u>Méristème I</u>		<u>Méristème 2</u>	
Nombre total de cinèses	123		335	
Anaphases	42	soit 34,15 %	153	soit 45,67 %
" en régression	18	" 14,63 %	57	" 17,01 %
Métaphases normales	7	soit 5,69 %	2	soit 0,60 %
" désorganisées	7	" 5,69 %	13	" 3,88 %
Stathmométaphases	1	" 0,81 %	9	" 2,69 %
Anaphases normales	2	soit 1,63 %	3	soit 0,90 %
" "lentes"	2	" 1,63 %	16	" 4,78 %
" en étoile	2	" 1,63 %	2	" 0,60 %
Stathmoanaphases			2	" 0,60 %
Télophases normales	28	soit 22,76 %	38	soit 11,34 %
" sans phragmo.	14	" 11,38 %	39	" 11,64 %
Stathmotélophases			1	" 0,30 %

Après 24 heures de "retour" la croissance est lente, l'extrémité des racines se recourbent en "crochets". Les sujets traités ne se distinguent des racines témoins que par la présence de doubles prophases et doubles télophases.

Ultérieurement, la cytologie reprend peu à peu un aspect normal.

Les phénomènes observés pour 2 heures de traitement et retour sont identiques à ceux qui ont été décrits pour 1 heure d'action mais l'évolution en est plus rapide. L'action mitoclasique n'est pas plus intense et après 24 heures de séjour sur milieu normal toutes les racines sont mortes sauf une.

En somme, même avec des concentrations élevées employées en traitement bref, nous n'avons jamais obtenu d'altération de l'appareil mitotique comparable à celle de la colchicine.

Conclusion

L'intoxication des racines par le dithioérythritol est encore perceptible à $5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml et se traduit par un ralentissement de la croissance.

Susceptible d'autooxydation, le dithiol se montre toxique en moins de 7 jours et mitodépresseur pour $5 \cdot 10^{-7}$ mol/ml à condition que les solutions soient renouvelées journallement.

Le mitodépresseur résulte du blocage des prophases qui ont tendance à retourner de plus en plus fréquemment en interphase.

Un traitement de 3 heures avec $5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml permet l'apparition des premières stathmométaphases dont les chromosomes courts et épais témoignent d'une toxicité intense. En même temps, l'altération chromatiniennne s'exprime sous forme de ponts d'agglutination anaphasiques et télophasiques.

C'est pour un traitement de 6 heures avec 10^{-5} mol/ml que l'inhibition fusoriale frappe toutes les métaphases mais rarement les anaphases et les télophases.

Le dithioérythritol n'exerce jamais d'activité mitoclasique totale, il est pour cela beaucoup trop toxique.

ANTAGONISME COLCHICINE - DITHIOERYTHRITOL

Nous avons effectué deux essais d'antagonisme avec 10^{-6} mol/ml et $5 \cdot 10^{-7}$ mol/ml de dithioérythritol. Jamais l'action mitoclasique de l'alcaloïde n'a été inhibée ni même simplement retardée.

C - COMPOSES A LIAISON DISULFURE

1 - Action cytologique du dithiodiglycol

Données bibliographiques

Connaissant, d'une part, l'extrême importance du rapport thiol-disulfure dans divers phénomènes cellulaires et connaissant, d'autre part, les effets cytologiques du β mercaptoéthanol, il était évidemment tentant de soumettre les cellules au dithiodiglycol pour essayer de mettre en relief les relations qui existent entre un composé sulphydrylé et son produit d'oxydation. Le reste de la molécule étant identique, il était logique de penser que seuls interviendraient les groupes - SH et - S - S - et que, par conséquent, de la comparaison des effets obtenus en fonction des concentrations on serait en mesure de comprendre l'influence de l'équilibre - SH / - S - S - sur un processus physiologique particulier.

Cependant, ce raisonnement, théoriquement valable, n'a pas jusqu'ici reçu de confirmation définitive. BRACHET (23), dans un article consacré à l'influence des composés soufrés sur la morphogénèse, s'est employé à comparer mercaptoéthanol et dithiodiglycol. Il en ressort que prétendre, à première vue, que mercaptoéthanol et dithiodiglycol agissent en opposition sur les mêmes phénomènes est une position un peu simple et même un peu simpliste. Que l'antagonisme entre les 2 substances ne soit pas systématique est, d'ailleurs, suggéré par plusieurs résultats expérimentaux.

Effet cytologique

Tout d'abord, la toxicité exercée au niveau des cellules par le dithiodiglycol est aussi violente que celle du β mercaptoéthanol et se traduit par une action nocive sur l'appareil mitotique de l'oeuf d'Amphibiens (107) dans lequel les fibres astrales et fusoriales perdent leur orientation parallèle caractéristique. De même, le matériel nucléaire subit de profonds dommages et prend un aspect vacuolisé en "grappes de raisins" (196), alors que l'aspect interphasique des cellules animales est modifié par l'altération de la chromatine (105).

Lorsque le dithiodiglycol est administré à des oeufs d'oursin à des intervalles de temps réguliers compris entre le début de la prophase et la fin de la métaphase, il peut provoquer la désorganisation de la structure fibreuse de l'appareil mitotique et réduire sa stabilité mais, suivant le moment de l'administration précoce ou tardif, les modalités sont variables (196).

L'exposition des oeufs à des concentrations diverses de dithiodiglycol immédiatement après la fertilisation entraîne la disparition des asters et la destruction du fuseau et il en résulte des cellules binucléées. Si l'exposition a lieu au moment de la prophase de la 1ère segmentation, les mouvements anaphasiques peuvent être supprimés. Chez les oeufs traités pendant la prométaphase, le fuseau fonctionne plus ou moins bien mais, en revanche, il apparaît beaucoup plus réduit que chez les témoins. A ce stade, l'obtention de cellules binucléées ne doit pas être exclue. Enfin, si on administre le dithiodiglycol en fin de métaphase, la segmentation se déroule normalement. Dans la plupart des cas, alors que la caryocinèse semble se faire aussi rapidement que dans les témoins, il y a un retard de plus en plus grand de la cytokinèse en fonction des concentrations.

Ainsi, pour le dithiodiglycol comme pour le mercaptoéthanol, il existe un moment privilégié de la mitose pendant lequel l'administration du composé disulfuré s'accompagne, à coup sûr, de la disparition du fuseau.

LIMBOSCH - ROLIN (105) constate que la croissance d'E. Coli et de S. Cerevisiae est supprimée à la fois par le mercaptoéthanol et par le dithiodiglycol. En outre, la forte odeur de mercaptoéthanol qui est dégagée lorsque les cellules sont en présence du composé oxydé peut, selon l'auteur, être attribuée à la présence d'une disulfure-réductase mise en évidence chez les levures (185).

Effets biochimiques

Nous ne possédons que fort peu de renseignements sur l'éventuel mode d'action biochimique du dithiodiglycol. Encore sont-ils contradictoires. En effet, l'augmentation du taux d'A R N du plasme périmucléaire de l'oeuf d'Artemia salina (61) ne s'accorde pas avec la diminution enregistrée chez les microorganismes (105) pendant l'inhibition de croissance.

Enfin, signalons que le dithiodiglycol a été utilisé par MAZIA et ses collaborateurs (132) pour isoler l'appareil mitotique en se basant sur l'hypothèse qu'un excès de liaisons disulfure protégerait l'intégrité du fuseau.

Résultats expérimentaux

Formule : $\text{CH}_2\text{OH} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH}$ PM = 154

Le dithiodiglycol, produit de l'oxydation du β mercaptoéthanol, est une substance liquide, visqueuse, inodore, miscible à l'eau en toutes proportions. Des concentrations élevées abaissent le pH du liquide de Knop que l'on ajuste alors avec de la potasse N/10.

L'étude des effets cytologiques du dithiodiglycol a été entreprise à l'aide d'une gamme de concentrations comprises entre 10^{-7} mol/ml et $2 \cdot 10^{-5}$ mol/ml. D'après les résultats obtenus, l'action du dithiodiglycol peut se définir en 4 degrés dus aux concentrations suivantes :

- Les concentrations allant de 10^{-7} à 10^{-6} mol/ml, dénuées de toxicité et d'effet cytologique.

- Les concentrations s'étalant de $2 \cdot 10^{-6}$ à 10^{-5} mol/ml, mortelles mais peu ou pas du tout mitoclasiques.

- La concentration $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, très mitoclasique et rapidement toxique.

- Les concentrations supérieures à $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, pour lesquelles l'action mitoclasique est accompagnée de noyaux morts de plus en plus nombreux.

a - Traitement continu

Effet des concentrations comprises entre 10^{-7} et 10^{-6} mol/ml

La croissance, très légèrement stimulée par 10^{-7} mol/ml, est ralentie pour 10^{-6} mol/ml si bien qu'après une semaine d'immersion dans cette solution les racines traitées ont une longueur moyenne inférieure d'un tiers à la longueur moyenne des racines du lot témoin. L'examen microscopique n'indique jamais d'altération de la mitose.

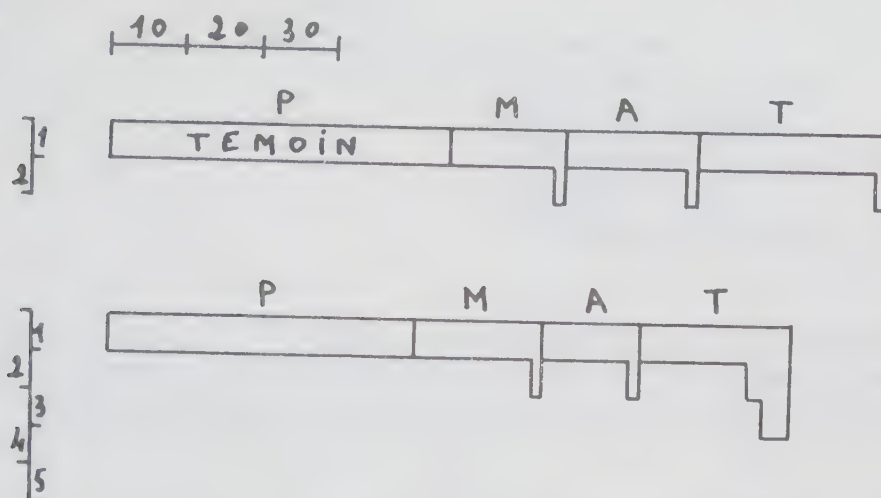
Effet des concentrations comprises entre $2 \cdot 10^{-6}$ mol/ml et 10^{-5} mol/ml

A partir du $2 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, et selon les concentrations, la durée de vie des sujets traités varie de 2 à 6 jours.

Pour $2 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, l'inhibition de croissance débute en 24 heures, s'accroît les jours suivants et s'accompagne d'une mitodépression perceptible en 48 heures et totale en 4 jours. En aucun cas, nous n'avons constaté d'anomalies fusoriales chez les mitoses en cours. Lorsque la mort survient, toutes les mitoses ont disparu des méristèmes.

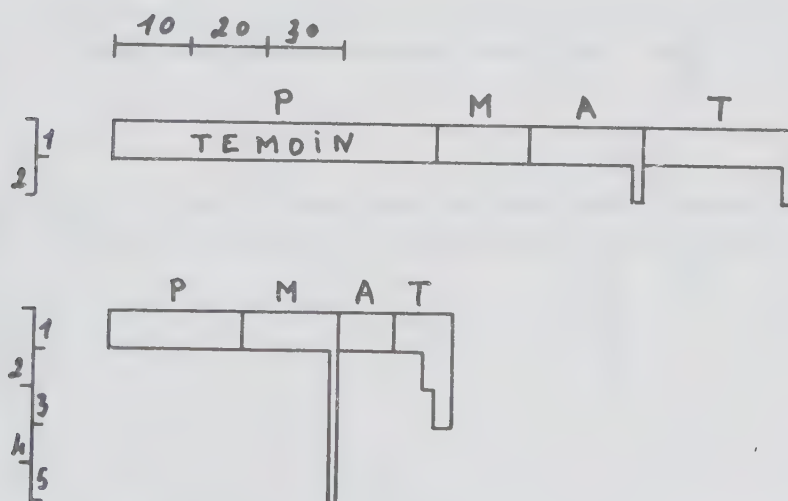
Pour $4 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, l'allongement, déjà très faible en 24 heures, est nul les jours suivants. En 3 heures, les index mitotiques sont légèrement diminués par rapport aux index témoins. Les proportions des différentes phases de la mitose ne subissent pas de variation significative. Les mitoses sont le plus souvent normales. Toutefois, on note quelques métaphases désorganisées, des anaphases qui possèdent des pôles fusoriaux larges avec des chromosomes grossièrement disposés parallèlement les uns par rapport aux autres.

Cette observation, faite par LIMBOSCH - ROLIN (107), témoigne vraisemblablement d'un ralentissement de l'ascension anaphasique. Enfin, les télophases sont parfois dépourvues de phragmoplaste.



GRAPH n° 30 : Dithiodiglycol, $4 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, 3 heures.

En 24 heures, la chute des index mitotiques peut atteindre 60 % (45,45 ‰ et 40,66 ‰). On relève une accumulation de métaphases avec, en contrepartie, une diminution de prophases ; une assez forte proportion d'anaphases "lentes" ; des télophases sans phragmoplaste et de rares cellules binucléées. En même temps, apparaissent les premières stathmocinèses sous forme de stathmométaphases.



GRAPH n° 31 : Dithiodiglycol, $4 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, 24 heures

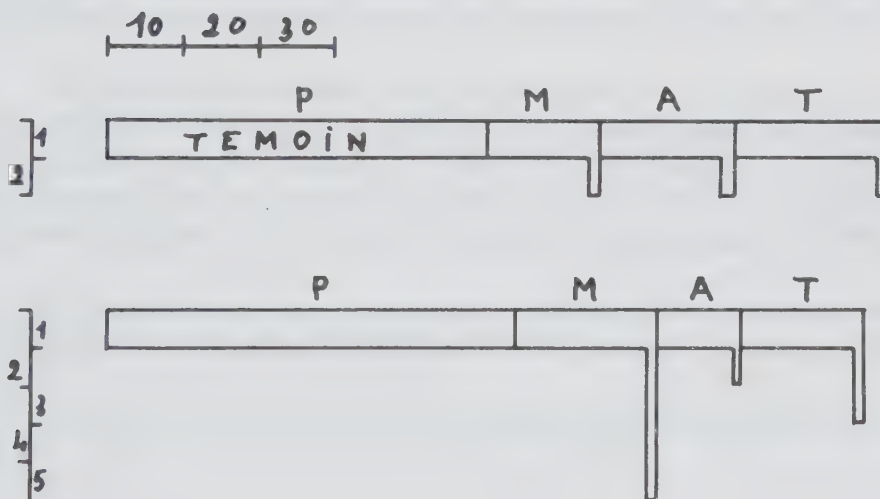
Après 48 heures, les mitoses sont si rares que nous avons dû effectuer des numérations totales qui ont donné les résultats suivants :

méristème I	1 prophase
méristème 2	23 mitoses dont 10 prophases
	3 métaphases normales
	1 stathmométaphase
	3 métaphases désorganisées
	1 anaphase normale
	5 télophases normales

Pour 6 et 8. 10^{-6} mol/ml, les résultats ne sont pas essentiellement différents de ceux que nous venons de décrire. Seules, les stathmocinèses augmentent peu à peu à partir de 3 heures. L'effet mitodépresseur est intense en 24 heures. La mort se produit en 6 jours pour 6. 10^{-6} mol/ml et en 3 jours pour 8. 10^{-6} mol/ml.

Pour 10^{-5} mol/ml, un traitement de 3 heures modifie peu l'activité mitotique. Les métaphases s'accumulent et 14 % d'entre elles sont des stathmocinèses. Les anaphases et les télophases restent inaltérées à l'exception de rares anaphases "lentes" et des télophases dépourvues de phragmoplaste.

C'est pour cette concentration que se manifestent les premiers signes de l'activité chromatoclasique du dithiodiglycol sous forme de ponts télophasiques.



GRAPH n° 32 : Dithiodiglycol, 10^{-5} mol/ml, 3 heures

Ensuite, les mitoses disparaissent progressivement. En 48 heures, il ne reste que 6 mitoses assez altérées sur un méristème tandis que sur l'autre on note un cas de caryorrhexis que nous n'avons retrouvé qu'exceptionnellement.

Si le traitement est interrompu après 24 heures, la période de mitostase se poursuit encore durant les premières heures de séjour sur milieu normal. Cependant, après 24 heures, les mitoses réapparaissent.

En résumé, les concentrations comprises entre $2 \cdot 10^{-6}$ mol/ml et 10^{-5} mol/ml exercent un effet mitodépresseur et un effet cytotoxique. De plus, les premiers symptômes d'activité mitoclasique se manifestent pour $4 \cdot 10^{-6}$ mol/ml en 24 heures mais sont surtout remarquables pour 10^{-5} mol/ml en 3 heures, concentration pour laquelle la chromatoclasie s'exprime également.

A partir de $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, l'aspect cytologique des sujets traités correspond à la mort en moins de 24 heures.

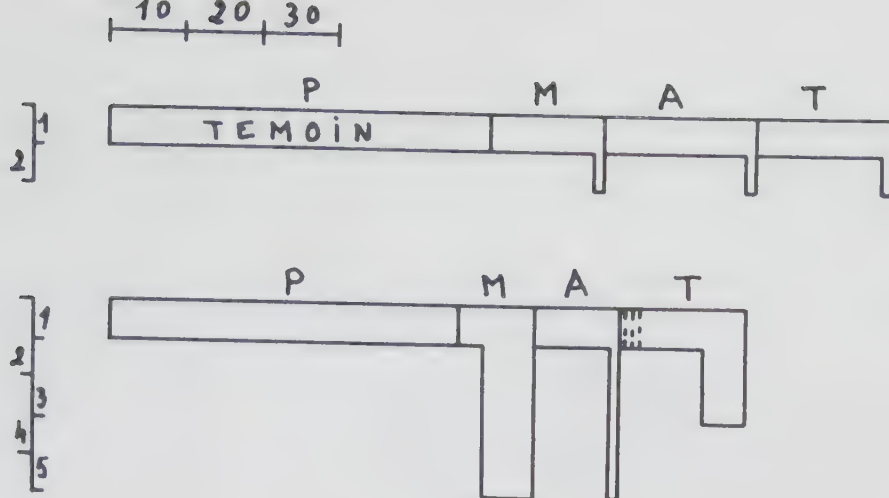
Effet de la concentration $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/ml

Après 3 heures d'immersion, l'activité mitotique des cellules méristématiques accuse une baisse de 20 % environ. En même temps, on observe une légère accumulation de prophases dont certaines ont des chromosomes très despiralisés, flexueux. Nous avons compté ces images dans la catégorie des prophases "lâches". Elles correspondent vraisemblablement au stade prométaphasique. Le nombre élevé de ces mitoses suggère un blocage de la cinèse à ce niveau.

L'inhibition fusoriale frappe de nombreuses métaphases qui sont alors en stathmocinèses. Les anaphases sont généralement normales, quelquefois "lentes", les télophases normales ou sans phragmoplaste. Les chromosomes télophasiques provenant d'anaphases "lentes" ne présentent que tardivement le phénomène de tassement polaire. Les cellules binucléées ne sont pas très fréquentes.

Apparemment, il y a quelques ponts télophasiques mais un examen attentif prouve que certains "ponts" résultent de chromosomes retardataires.

Un prélèvement effectué à 24 heures démontre l'aspect létal des racines.



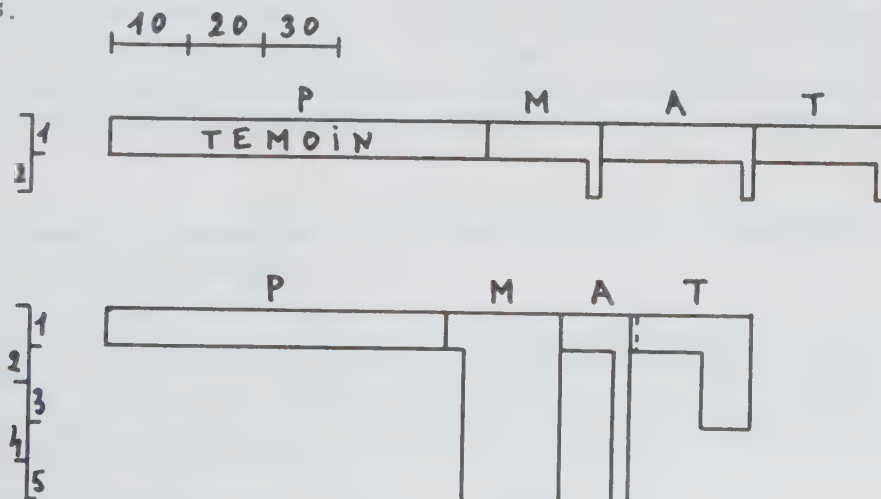
GRAPH n° 33 : Dithiodiglycol, 1,25. 10^{-5} mol/ml, 3 heures

En résumé, cette concentration se caractérise par une disproportion des stades de la mitose, par une activité mitoclasique quasi totale sur les métaphases après 3 heures d'action et par la rapidité de la toxicité.

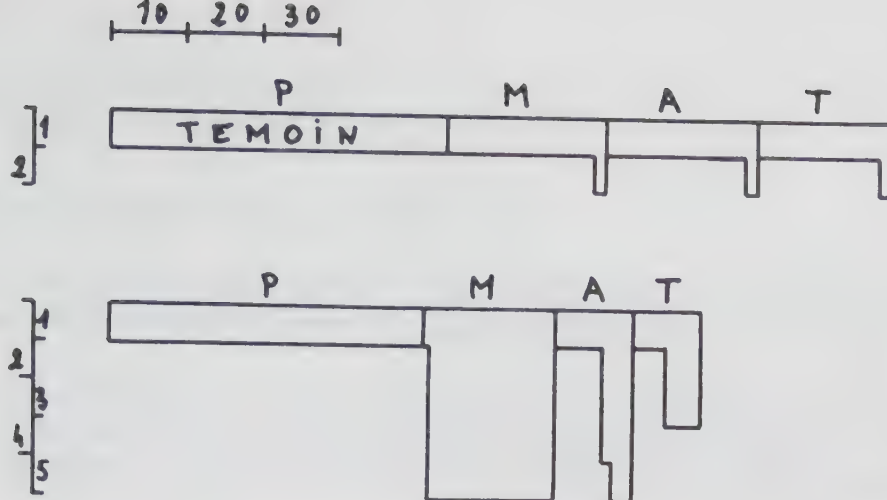
Effet des concentrations 1,5 et 2. 10^{-5} mol/ml

Pour ces concentrations, les phénomènes observés sont parallèles à ceux qui ont été obtenus avec les concentrations précédentes mais leur manifestation est plus intense et leur évolution plus rapide. Des noyaux morts envahissent peu à peu les préparations.

Après 3 heures, les index mitotiques sont abaissés assez fortement. 10 % des prophases sont des prophases "lâches" ; toutes les métaphases sont pratiquement en stathmocinèses. Les altérations des fibres fusoriales affectent même certaines anaphases : stathmoanaphases et anaphases en étoile. Certaines télophases sans phragmoplaste et certaines cellules binucléées exhibent des aberrations de localisation du phragmoplaste. Une légère activité chromatoclasique porte sur les anaphases et les télophases.



GRAPH n° 34 : Dithiodiglycol 1,5. 10^{-5} mol/ml, 3 heures.



GRAPH n° 35 : Dithiodiglycol 2.10^{-5} mol/ml, 3 heures

Les racines sont tuées en 24 heures.

En résumé, l'inhibition fusoriale se produit d'emblée et affecte tous les stades de la mitose. Cependant, ces concentrations sont extrêmement toxiques.

b - Traitement discontinu

Nous avons traité des racines par les concentrations rapidement toxiques en traitement continu, $1,25.10^{-5}$ mol/ml, $1,5.10^{-5}$ mol/ml, 2.10^{-5} mol/ml pendant 1 heure et 3 heures.

Effet de la concentration $1,25.10^{-5}$ mol/ml

Si le traitement est interrompu après 1 heure et est suivi du "retour" sur milieu normal, une mitodépression s'installe en 2 heures de retour en même temps qu'apparaissent des stathmométaphases et des cellules binucléées. Des ponts d'agglutination touchent quelques anaphases et télophases. La période mitostatique est néanmoins superficielle, car, après 4 heures de retour, des mitoses assez nombreuses peuvent être observées. Seule la croissance radiculaire est encore légèrement ralentie.

Pour 3 heures d'immersion, la dépression mitotique et l'inhibition fusoriale se manifestent à l'issue du traitement.

Après 2 heures sur liquide de Knop, 4 méristèmes ne renferment que quelques prophases. Tous les autres stades ont disparu. L'absence de mitose persiste pendant 2 heures encore. Après 24 heures, l'activité mitotique se rétablit. Seule la croissance est encore affectée.

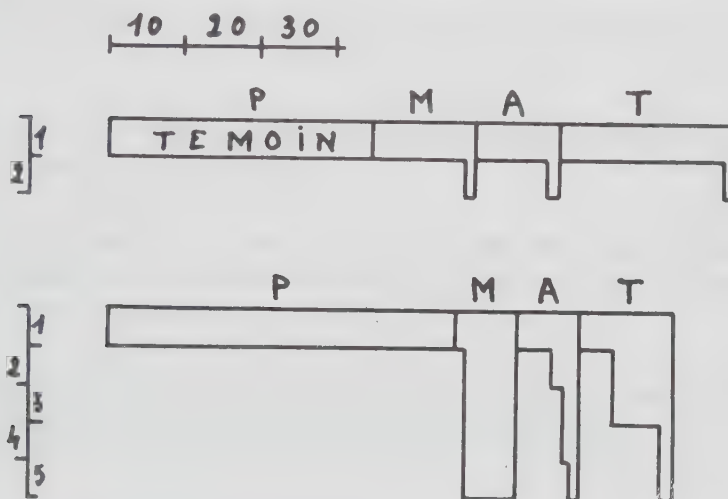
L'inhibition fusoriale obtenue avec cette concentration est très superficielle et accompagnée d'un effet mitodépresseur qui survient rapidement.

Effet de la concentration $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml

Un séjour de 3 heures dans la solution de dithiodiglycol réduit déjà sensiblement l'activité mitotique puisque les index sont abaissés de 20 % environ.

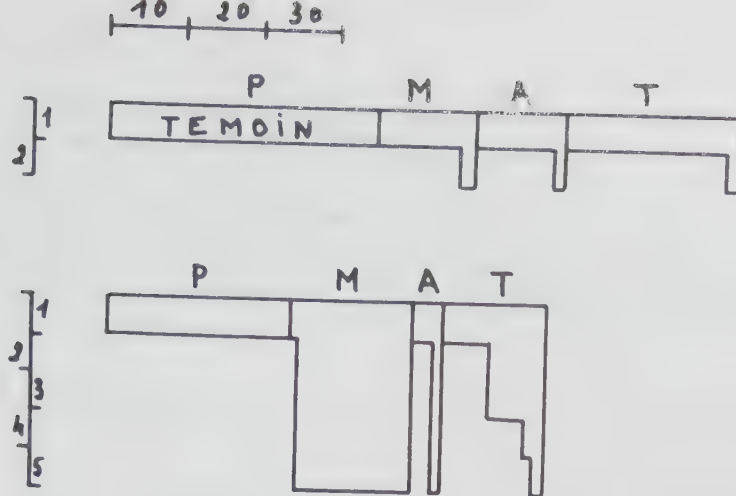
Les anomalies fusoriales frappent 90 % des métaphases mais plus rarement les anaphases qui sont soit retardées soit en hémianaphases. Plus de la moitié des télophases n'ont pas de phragmoplaste ou bien ce dernier est aberrant ou incomplet.

Une légère activité chromatoclasique touche anaphases et télophases.



GRAPH n° 36 : Dithiodiglycol $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 3 heures de Traitement

Une heure après le report sur milieu normal, on observe quelques noyaux présentant une chromatolyse avancée et des mitoses fixées. Les prophases et anaphases diminuent ainsi que l'index qui se situe aux environs de 60 %. Toutes les métaphases sont bloquées alors que l'inhibition fusoriale ne s'exerce que sur une petite proportion des anaphases et des télophases.



GRAPH n° 37 : Dithiodiglycol $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 1 h Retour

L'effet mitodépresseur s'intensifie après 2 heures et aucune mitose ne se déroule après 3 heures de "retour".

Vingt-quatre heures après la fin du traitement, les cinèses réapparaissent nombreuses et normales. L'intoxication antérieure ne se signale que par des cellules binucléées et des ponts anaphasiques et télophasiques.

L'inhibition fusoriale et l'inhibition prophasique s'exercent simultanément. Une période de mitostase s'installe après 3 heures de retour.

Effet de la concentration $2 \cdot 10^{-5}$ mol/ml

A la fin de 3 heures de traitement, un blocage métaphasique se produit d'emblée et les divisions sont beaucoup moins nombreuses que sur les témoins. Les anaphases et les télophases sont rarement en stathmocinèses.

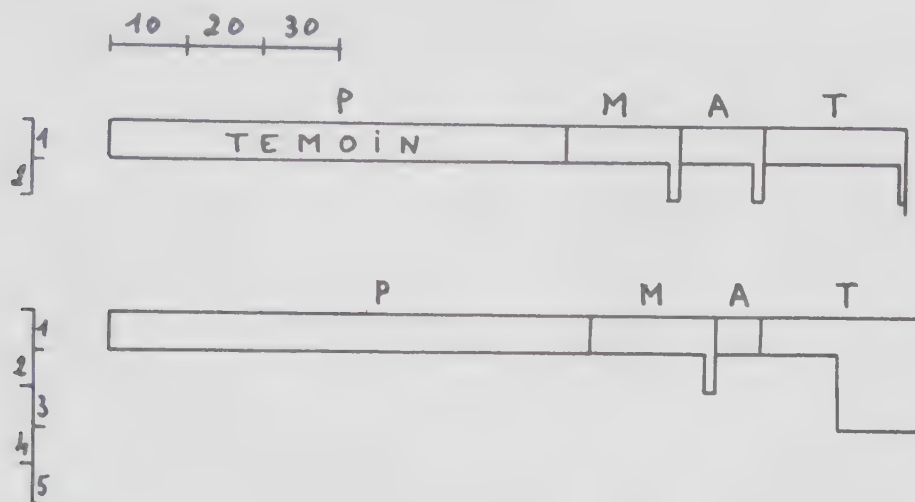
Après un "retour" de 2 heures, la disparition des mitoses est encore plus nette. L'action mitoclasique atteint toutes les mitoses en cours. Mais, parallèlement, des agglutinations frappent quelques cinèses et les noyaux morts envahissent les méristèmes qui deviennent translucides.

Après 3 heures, la moitié des sujets traités sont morts et l'effet mitodépresseur est total. Un séjour de 4 heures sur milieu normal n'améliore pas l'aspect cytotologique.

En 24 heures, les méristèmes qui ont survécu au traitement montrent des séquelles de l'intoxication. La croissance est toujours bloquée. L'activité mitotique est variable d'un méristème à l'autre et peut aller de la mitodépression complète à la division active. Dans ce cas, les métaphases et les anaphases sont extrêmement nombreuses.

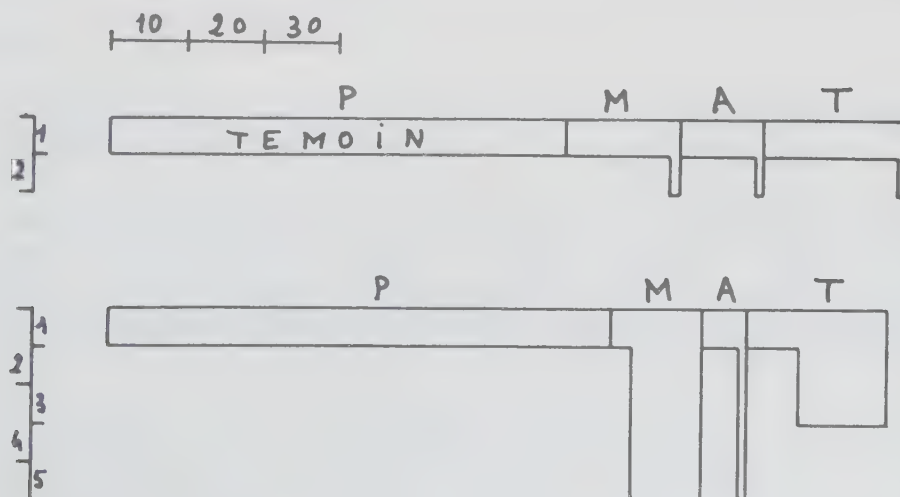
Les jours suivants, quelques racines meurent tandis que celles qui sont viables portent des cicatrices sus-méristématiques.

L'expérience a été répétée en limitant à 1 heure l'immersion dans le dithiodiglycol. A l'issue de celle-ci, on ne note pas d'altération importante de la cytologie, à l'exception de métaphases plus ou moins désorganisées avec des chromosomes longs et graciles.



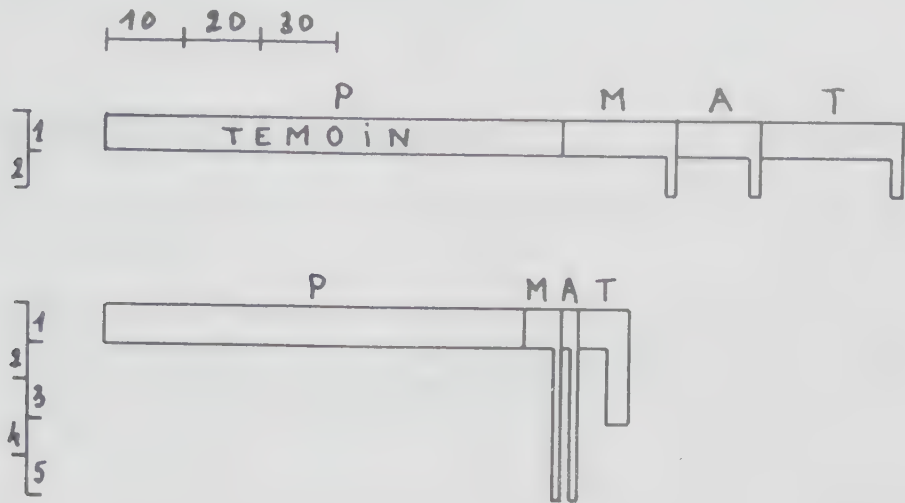
GRAPH n° 38 : Dithiodiglycol, $2 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 1 h Traitement

Après un "retour" de 2 heures, les prophases s'accumulent tandis qu'on enregistre une diminution des anaphases. Le fuseau est absent chez la plupart des métaphases mais est fonctionnel chez de nombreuses anaphases et télophases qui, en outre, ne possèdent pas de phragmoplaste pour la majorité d'entre elles. Certaines anaphases ont des pôles très larges et des chromosomes parallèles. L'activité chromotoclasique frappe anaphases et télophases. Des cellules binucléées sont également visibles.



GRAPH n° 39 : Dithiodiglycol $2 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 2 h Retour

Après 3 heures, l'index mitotique baisse de 40 %. Les prophases peuvent représenter jusqu'à 80 % des mitoses. Un certain nombre tend à retourner à l'état interphasique. L'activité mitoclasique s'efface progressivement. Nombreuses sont les télophases sans phragmoplaste et les cellules binucléées.



GRAPH n° 40 : Dithiodiglycol, $2 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 3 h Retour

En 24 heures, la croissance est légèrement ralentie et le fonctionnement fusorial et l'activité mitotique sont normaux chez tous les méristèmes.

En résumé, seul un traitement de 1 heure avec cette concentration est compatible avec la survie de toutes les racines et une destruction fusoriale qui, cependant, se limite aux métaphases en raison de la très forte mitodépression.

Conclusion

Le Dithiodiglycol est pratiquement inactif à la concentration de 10^{-6} mol/ml, excepté un léger ralentissement de la croissance radiculaire.

Mortel en 6 jours pour $2 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, il est également mitodépresseur en 48 heures. La disparition progressive des mitoses est le résultat d'un effet double. D'abord mitoralentisseur et provoquant, de ce fait, une accumulation de métaphases et d'anaphases, il est ensuite inhibiteur prophasique à partir de 10^{-5} mol/ml.

L'action mitoclasique débute à partir de $4 \cdot 10^{-6}$ mol/ml en 24 heures et gagne peu à peu en intensité. Aux concentrations de $1,25 \cdot 10^{-5}$, $1,5 \cdot 10^{-5}$ et $2 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, toutes les métaphases et une partie des anaphases sont frappées par la destruction du fuseau. Si le traitement par ces concentrations élevées est interrompu suffisamment tôt, l'action sur l'appareil fusorial peut être distincte de l'action toxique et est suivie d'une période mitostatique plus ou moins intense.

ANTAGONISME DITHIODIGLYCOL - COLCHICINE

Le Dithiodiglycol est utilisé à la concentration de $2 \cdot 10^{-6}$ mol/ml qui, employée seule, est inactive.

Une heure après le début du traitement par la colchicine, le taux en stathmocinèses et en hémicinèses est plus élevé dans le témoin colchicine que dans l'essai d'antagonisme, ainsi que les index mitotiques respectivement de 116,91 et 118,63 ‰, contre 101,75 et 103,60 ‰.

Après un retour de 2 heures, les index mitotiques s'élèvent aux environs de 130 ‰, dans le témoin colchicine dans lequel on compte plus de 30 % de métaphases pour l'ensemble des cinèses. Parallèlement, l'inhibition fusoriale frappe de très nombreuses mitoses aussi bien métaphases qu'anaphases et télophases. Par contre, dans le bulbe "antagonisme", les index n'augmentent guère et on ne dénombre qu'une légère accumulation de métaphases, 25 % des mitoses. Le fuseau manque chez beaucoup de cellules mais le pourcentage d'images intactes est supérieur à celui que l'on peut constater dans le témoin colchicine.

TABEAU N° 7

Antagonisme Colchicine - Dithiodiglycol
Mitoses normales pour 100 mitoses (prophases non comprises)

Prélèvement	Témoin Colchicine	Témoin Dithiodiglycol	Antagonisme
1 h T	44,05	100	73,25
	et	et	et
	52,05	100	77,63
2 h R	16,24	97,47	45,05
	et	et	et
	17,59	98,09	42,08
3 h R	10,20	97,45	54,45
	et	et	et
	12,50	98,71	53,80
4 h R	16,18	100	95,68
	et	et	et
	27,46	100	94,27

La proportion d'anomalies visibles, après un retour de 3 heures, demeure à peu près constante dans le témoin "mitoclasique" : plus de 40 % des images. Les index mitotiques sont encore très perturbés. Mais, eu même moment, dans le bulbe "antagonisme", on note de moins en moins de mitoses anormales : celles-ci ne représentent que 28 % des cinèses, tandis que la proportion de cellules en division est sensiblement stable.

En 4 heures de retour, l'action de la colchicine commence à s'atténuer, d'ailleurs irrégulièrement selon les bulbes, mais est encore suffisamment intense pour que seulement 16 et 27 % des mitoses soient normales. Les index mitotiques sont encore très élevés. Pendant ce temps, les cellules en mitose diminuent légèrement dans le bulbe "antagonisme" pour lequel toutes les cinèses s'avèrent déjà pratiquement normales.

Vingt-quatre heures après le traitement par l'agent mitoclasique, des restes de stathmocinèses et d'hémicinèses sont encore présents dans le témoin "colchicine" alors qu'ils ont complètement disparu ou presque du lot "antagonisme".

TABLEAU N° 8

Antagonisme Colchicine - Dithiodiglycol

Prélèvement	Témoin Colchicine	Témoin Dithiodiglycol	Antagonisme
1 h T	30, 14 et 35, 21	0 et 0	10, 20 et 15, 69
2 h R	74, 53 et 79, 21	0 et 0	41, 27 et 37, 33
3 h R	78, 89 et 70, 59	0 et 0	11, 76 et 12, 73
4 h R	65, 57 et 38, 71	0 et 0	0 et 0

Stathmométaphases pour 100 métaphases

En résumé, le dithiodiglycol ne s'oppose pas catégoriquement à l'effet mitoclasique de la colchicine mais, sous son influence, celui-ci est retardé et le retour à la normale beaucoup plus rapide.

ASSOCIATION MERCAPTOETHANOL - DITHIODIGLYCOL

Etant donné que le mercaptoéthanol et dithiodiglycol sont capables chacun à des degrés divers d'inhiber le fuseau, nous nous sommes demandé si leur association, même à des concentrations qui, employées seules, sont inactives, influencerait plus nettement encore la mise en place de l'appareil fusorial.

Association mercaptoéthanol 2. 5. 10 $\cdot 10^{-6}$ mol/ml - Dithiodiglycol 2. 10 $\cdot 10^{-6}$ mol/ml

Les racines traitées par le mercaptoéthanol seul montrent un ralentissement de croissance appréciable à partir de 48 heures qui s'accroît de jour en jour. En fin d'expérience, quelques racines deviennent translucides et la longueur moyenne est de 30 mm contre 80 mm pour le lot témoin. Les cellules ne subissent pas d'altération mais les mitoses se raréfient de plus en plus de 24 heures à 7 jours.

La croissance des méristèmes traités uniquement par le dithiodiglycol est réduite à partir du 3^{ème} jour et le 7^{ème} jour, la longueur moyenne des racines est de 50 mm contre 80 mm pour les racines témoins. L'activité mitotique s'atténue progressivement en 72 heures mais les cinèses restent morphologiquement intactes.

Les racines soumises à l'association ne s'allongent pratiquement plus à partir de 48 heures. Le 7^{ème} jour tous les méristèmes sont morts. Au point de vue cytologique, une mitodépression s'installe en 24 heures tandis que quelques stathmométaphases apparaissent. Les jours suivants, la dépression mitotique est totale.

En résumé, l'effet de l'association s'exerce principalement sur la croissance et sur l'activité mitotique. Il n'est pas possible, dans ces conditions de mettre en évidence un renforcement des propriétés mitoclasiques. C'est pourquoi, dans une seconde expérience, nous avons utilisé des concentrations beaucoup plus élevées de telle façon que les effets de l'association ne puissent s'exercer que sur 1 ou 2 cycles mitotiques au maximum.

Association mercaptoéthanol $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml

Dithiodiglycol 10^{-5} mol/ml

L'examen microscopique des racines traitées par le mercaptoéthanol et prélevées d'heure en heure ne révèle jamais d'inhibition fusoriale complète. Les numérations de métaphases donnent 20 % de stathmocinèses en 4 heures au maximum. En revanche, la proportion de métaphases désorganisées ne cesse d'augmenter de 1 à 6 heures. En même temps, on note de nombreuses prophases et cellules binuclées. En 6 heures, les racines deviennent translucides mais demeurent turgescentes.

Dans les racines traitées par le dithiodiglycol, la quantité de stathmométaphases s'accroît d'heure en heure : 30 % en 4 heures et 100 % en 6 heures. Les anaphases sont souvent ralenties et les télophases sans phragmoplaste. On relève également des prophases normales, lâches ou en régression.

Les racines traitées par l'association deviennent flaccides en 4 heures mais c'est seulement à la 6ème heure que la mort se manifeste à l'examen microscopique. Les index mitotiques chutent de 40 % et la répartition des mitoses est très inégale. En 3 heures, les prophases représentant 70 % environ des mitoses et le nombre d'anaphases est extrêmement réduit. La proportion de stathmométaphases augmente à chaque prélèvement et est toujours supérieure à celle des témoins respectifs : en 4 heures, on note 85 % de métaphases bloquées contre 30 % et 20 % dans les témoins.

TABLEAU N° 9

Association mercaptoéthanol $2 \cdot 10^{-5}$ mol/ml
dithiodiglycol 10^{-5} mol/ml

Prélèvement	Mercapto- éthanol	Dithiodiglycol	Mercaptoéthanol + Dithiodiglycol
1 heure	0 et 0	0 et 0	0 et 0
2 heures	1,96 et 1,96	5,55 et 0,96	17,82 et 17,82
3 heures	8,00 et 8,00	17,00 et 26,00	63,00 et 67,32
4 heures	17,47 et 20,38	30,00 -	84,31 et 87,25

Stathmométaphases pour 100 métaphases

En résumé, une activité mitoclasique prend naissance sous l'influence de l'association des deux composés, qui est beaucoup plus importante que celle qui est exercée par chacun des 2 produits. Cependant, rien ne permet de savoir à quel composé est due la potentialisation des effets de l'autre. C'est pourquoi, dans une autre série d'expérience, la concentration de mercaptoéthanol puis la concentration de dithiodiglycol étaient abaissées et associées à la concentration primitive de l'autre composé.

Association mercaptoéthanol $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml

Dithiodiglycol $4 \cdot 10^{-6}$ mol/ml

Les racines traitées par le mercaptoéthanol sont le siège d'une activité mitoclasique discrète. A la 4ème heure, nous avons relevé 9 % de stathmométaphases et 55 % de métaphases désorganisées.

Les racines traitées par le dithiodiglycol seul ne montrent que d'exceptionnelles stathmocinèses au cours des prélèvements successifs.

Dans les racines traitées par l'association, on compte 17 à 18 % des stathmocinèses à la 4ème heure.

TABLEAU N° 10

Association mercaptoéthanol $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml
dithiodiglycol $4 \cdot 10^{-6}$ mol/ml

Prélèvement	mercaptoéthanol	Dithiodiglycol	Mercaptoéthanol + dithiodiglycol
2 heures	0 et 0	0 et 0	2 et 1
3 heures	2 et 4	1 numération totale et 2 numération totale	11 num. totale et 10 num. totale
4 heures	9 et 9	2 et 1	num. totale 17 et 18

Stathmométaphases pour 100 métaphases

En résumé, l'utilisation simultanée des 2 composés se traduit par une légère augmentation de l'inhibition fusoriale qui n'atteint pas le niveau obtenu avec une concentration supérieure en dithiodiglycol.

Association mercaptoéthanol 10^{-5} mol/ml

Dithiodiglycol 10^{-5} mol/ml

Sous l'influence du mercaptoéthanol, les divisions en cours ne changent pas d'aspect mais sont réduites en nombre dans les dernières heures d'expériences. Les numérations effectuées donnent 1 % de stathmocinèses alors que les métaphases désorganisées ne dépassent pas 25 % des métaphases.

Chez les racines traitées par le dithiodiglycol, l'activité mitotique diminue peu à peu. L'effet du dithiodiglycol se manifeste à la 4^{ème} heure. On compte alors 20 % de stathmométaphases. L'heure suivante, toutes les métaphases sont bloquées. On relève également une accumulation des prophases et une diminution des anaphases.

TABLEAU N° 11

Association mercaptoéthanol 10^{-5} mol/ml
dithiodiglycol 10^{-5} mol/ml

Prélèvement	mercaptoéthanol	Dithiodiglycol	Mercaptoéthanol + dithiodiglycol
2 heures	0 et 0	1 -	9 et 11
3 heures	1 -	9 et 9	52 et 50
4 heures	1 et 1	18 et 13 numération totale	66 et 57 numération totale

Stathmométaphases pour 100 métaphases

Les racines soumises à l'association montrent, dès 2 heures, 10 % de stathmométaphases, taux qui augmente ensuite et avoisine 60 % à la 4ème heure tandis que l'activité mitotique décroît. Ici encore, on note une disproportion de la répartition des différents stades de la mitose en faveur des prophases. On observe aussi des ponts d'agglutination télophasiques peu fréquente mais constants ainsi que des cellules binucléées assez nombreuses.

En résumé, dans le cas d'un traitement associant une concentration élevée de dithiodiglycol à une concentration faible de mercaptoéthanol, l'inhibition fusoriale est plus intense que dans les témoins respectifs. Il semble donc que ce soit le mercaptoéthanol qui influe sur l'activité mitoclasique du dithiodiglycol alors que l'inverse n'est pas vrai.

2 - Action cytologique du chlorhydrate de cystamine

Le chlorhydrate de cystamine ou cystine-amine ne provoque aucun trouble de la mitose, excepté des plaques métaphasiques rétractées à très hautes concentrations.

Ce produit ne protège pas non plus les cellules contre une agression de la colchicine et n'est pas, de ce fait, comparable au dithiodiglycol.

D - ANTIVITAMINES

1 - Action cytologique du 6-aminonicotinamide

Données bibliographiques

Effet cytologique

Le 6-aminonicotinamide, analogue structural de l'amide nicotinique, est doué de propriétés toxiques particulières qui ont motivé, pendant un moment, son emploi en chimiothérapie anticancéreuse. Et pourtant, si son efficacité est certaine contre certaines formes de tumeurs (73) telles que les adénocarcinomes mammaires (170), elle est extrêmement faible pour ne pas dire nulle contre la tumeur WALKER 256 de la souris et la leucémie lymphoïde bien que, parmi de nombreux dérivés de l'amide nicotinique, l'aminonicotinamide soit le plus toxique (158).

LEE et coll (102) mettent en évidence l'inhibition exercée par l'aminonicotinamide sur la croissance et la culture de fibroblastes d'embryon de poulet.

La nocivité de ce composé sur les cellules normales ou pathologiques est attribuée à son interférence avec des phénomènes d'oxydoréduction.

Effet biochimique

Dès 1955, JOHNSON et Mc COLL (84) notent que le nicotinamide et l'acide nicotinique s'opposent à l'aminonicotinamide dans certaines conditions. Le tryptophane également.

Plus tard, les mêmes auteurs (85) émettent l'idée que le 6-aminonicotinamide peut être incorporé dans une molécule de 6-amino NAD avec perte de NAD normal donc fonctionnel. D'ailleurs, un composé identifié au 6-amino NAD est détecté par chromatographie et spectrophotométrie dans le foie et les reins de souris traitées par l'analogue ainsi que dans des tissus néoplasiques de rats.

Ultérieurement, cette idée reçoit apparemment une confirmation définitive quand est démontrée la transformation, *in vivo* et *in vitro*, du 6-aminonicotinamide en analogues de NAD et NADP aussi bien dans des tissus sains (53) que dans des tissus tumoraux (54).

Théoriquement, la synthèse d'une molécule anormale de NAD doit retentir sur des processus variés comme par exemple des processus énergétiques.

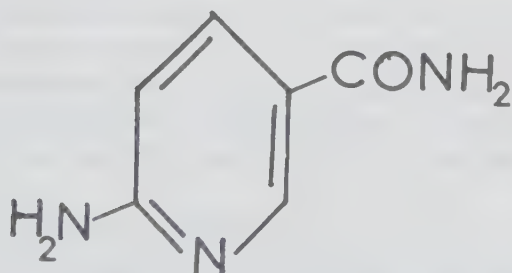
C'est ainsi que FRIEDLAND et coll. (65) constatent, après administration du 6-aminonicotinamide à des tissus cancéreux, une diminution de la teneur en ATP et en ADP avec une augmentation corrélative de la teneur en A M P. Bien plus, il semble que la diminution de l'ATP résulte à la fois de l'inhibition partielle de l'absorption d'oxygène qui est restaurée normalement par addition de substrat oxydable et de NAD (84) et de l'abaissement de la glycolyse aérobie des cellules in vitro (200) qui est rétablie par un excès de nicotinamide à la condition expresse qu'il soit administré avant l'analogue.

Le 6-aminonicotinamide a donc de nombreux effets, directs ou indirects, dus pour la plupart au remplacement de l'amide nicotinique dans le molécule de NAD ou NADP.

Cependant, les résultats de SHAPIRO, DIETRICH et SHILS (170) et ceux de DIETRICH, MUNIZ, FARINA et FRANKLIN (55) semblent s'opposer à cette conclusion. Les premiers n'enregistrent pas de variation appréciable du NAD tissulaire après administration de 6-aminonicotinamide et les seconds, après une étude enzymatique, radiochimique et biologique de la fixation de l'analogue marqué au ^{14}C par des tissus hépatiques et tumoraux, et en particulier par les mitochondries, arrivent à la conclusion que ce composé n'est métabolisé par aucun des systèmes enzymatiques connus en rapport avec la biosynthèse des nucléotides pyridiniques.

Quoi qu'il en soit et malgré les divergences dues peut-être à des protocoles expérimentaux ou à des matériels différents, il paraît raisonnable d'admettre que le 6-aminonicotinamide doit son activité biologique à sa faculté de former un amino NAD qui se fixerait bien sur une apo-déshydrogénase mais ne jouerait plus le rôle de transporteur d'hydrogène (149). D'ailleurs les activités de la 3 P-glycéraldéhyde déshydrogénase, de l' α -cétoglutarate-oxydase sont inhibées (53).

Résultats expérimentaux



PM = 123

L'aminonicotinamide est une poudre microcristalline blanche, lentement soluble dans l'eau. La solution, surtout si la concentration est élevée, est alcaline. C'est pourquoi nous avons dû réajuster le pH avec de l'acide nitrique dilué au 1/10.

L'étude de ce produit a été effectuée grâce à une gamme de concentrations allant de 10^{-6} mol/ml à $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, concentration maximale compatible avec une dissolution à froid. Nous distinguerons, en traitement continu, les concentrations 10^{-6} mol/ml, 5 et $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, 10^{-5} mol/ml, $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml et $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml.

a - Traitement continu

Effet de la concentration 10^{-6} mol/ml

Tout au long de l'expérience, les mitoses se déroulent normalement, bien qu'un méristème offre une mitodépression sévère en 4 jours. La manifestation la plus nette s'exerce sur la croissance des racines qui, après 7 jours, ont une longueur inférieure de moitié à la longueur des racines du lot témoin. On peut également remarquer l'absence du phragmoplaste chez quelques télophases et, par conséquent, la présence de quelques rares cellules binucléées.

Effet des concentrations 5 et $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml

La croissance des sujets traités, fortement ralentie dès 24 heures, n'est jamais supérieure à 1 mm les jours suivants. La morphologie des méristèmes subit une légère modification : les racines ont une certaine tendance à s'épaissir au niveau de la zone méristématique.

Au point de vue cytologique, on observe en 3 heures une dépression mitotique frappant surtout les métaphases, parfois désorganisées, et les anaphases. En même temps, on relève des chromosomes trapus et denses et quelques ponts d'agglutination témoignant d'une activité chromatoclasique.

En 24 heures et les jours suivants, l'activité mitotique reprend normalement. Les mitoses sont normales. C'est alors qu'apparaissent, en 3 jours pour $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, les premières cellules plurinucléées qui, lorsqu'elles sont en mitose, présentent des aberrations fusoriales. Pour cette concentration, le trouble principal consiste dans l'absence du phragmoplaste dans certaines télophases ou cellules issues de ces télophases ou bien dans un phragmoplaste incomplet ou en position anormale.

En résumé, c'est à partir de $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml que surviennent les premiers troubles fusoriaux, surtout dans les cellules tétra- ou polyploïdes résultant de l'inhibition du phragmoplaste et les premières manifestations de la chromatoclasie.

Effet de la concentration 10^{-5} mol/ml

La croissance des racines traitées par cette concentration subit un ralentissement en 24 heures et devient nulle en 4 jours. A partir du 2ème jour, les méristèmes se rétrécissent et la zone occupée par les mitoses est de plus en plus faible.

Après 3 heures, l'activité mitotique est déprimée. Parmi les mitoses qui subsistent ne sont pratiquement représentés que les stades prophasiques et télophasiques. Les métaphases sont de temps en temps désorganisées. Des troubles chromatinien sont signalés par des ponts anaphasiques et télophasiques.

En 24 heures, les métaphases et anaphases réapparaissent et quelques cellules binucléées sont notées. En 48 heures, on assiste à une nouvelle diminution du nombre des mitoses qui, cependant, restent inaltérées.

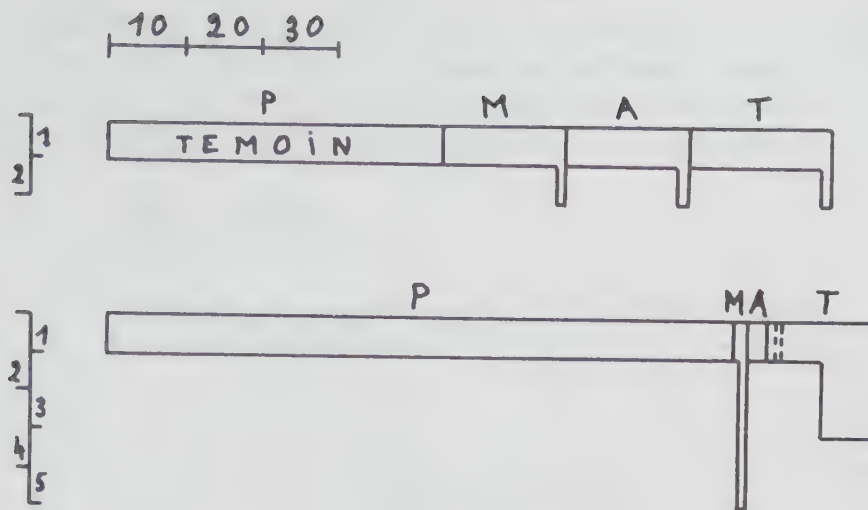
Les jours suivants, cette nouvelle phase mitodépressive se poursuit mais n'est qu'incomplète. Des cellules tri- ou tétranucléées, souvent pourvues d'un phragmoplaste aberrant, sont relevées ainsi que des cellules binucléées ou des cellules à phragmoplaste incomplet ou renfermant des micronoyaux.

En résumé, cette concentration réduit l'activité mitotique et provoque une inhibition partielle du fuseau de cytotérièse.

Effet de la concentration 1,25. 10^{-5} mol/ml

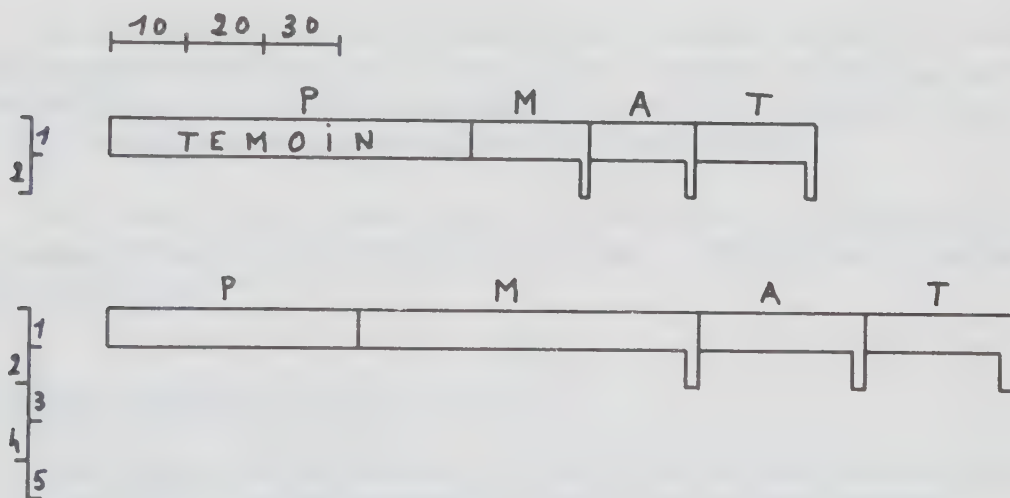
Les racines traitées s'allongent fort peu jusqu'au 3ème jour : 1 mm par jour environ et le 4ème jour la croissance est définitivement bloquée. En 48 heures, des constrictionns subméristématiques apparaissent. Au bout d'une semaine, la longueur moyenne des racines est de 25 mm contre 70 mm au témoin.

L'administration d'aminonicotinamide, à cette concentration, pendant 3 heures, entraîne une disparition pratiquement totale des métaphases et des anaphases dont l'ensemble ne présente que 4 % des mitoses. L'évènement le plus important réside dans l'accumulation de prophases chiffrées à 88 % environ des mitoses. En outre, la cloison fait défaut chez bon nombre de télophasas dont certaines possèdent des ponts d'agglutination. Après la reconstitution nucléaire, il en résulte de nombreuses cellules binucléées.



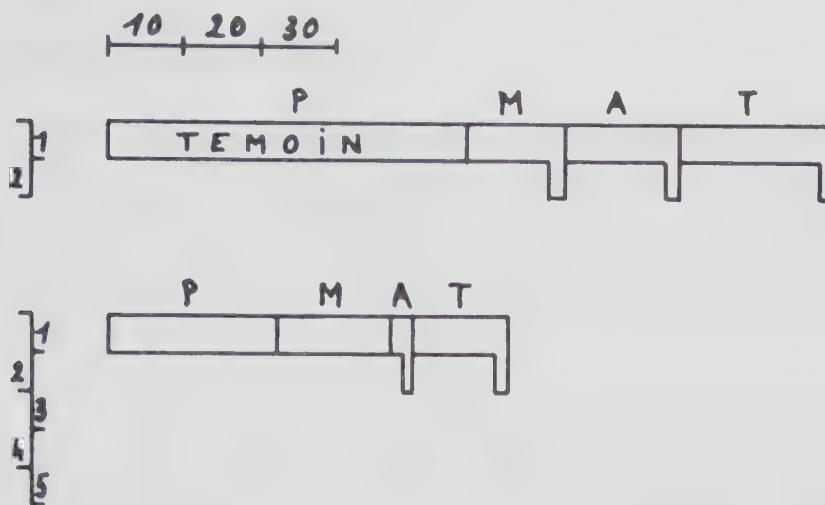
GRAPH n° 41 : 6-aminonicotinamide, $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 3 heures

Un traitement de 24 heures se signale par l'élévation des index mitotiques et se caractérise, au niveau de la mitose, par la chute très nette du taux des prophases. En revanche, les métaphases sont très fréquentes. Les cinèses sont le plus souvent normales.



GRAPH n° 42 : 6-aminonicotinamide, $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 24 heures

Après 48 heures, l'activité mitotique diminue régulièrement et on ne compte, en fin d'expérience, que 99 et 106 mitoses dans 2 méristèmes. Parallèlement, le fuseau achromatique fonctionne normalement mais le fuseau de cytodièrese peut être plus ou moins altéré. Quelques télophases sont dépourvues de cloisons. Quant aux cellules binucléées, leur proportion oscille entre 15 et 20 ‰.



GRAPH n° 43 : 6-aminonicotinamide, $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 48 heures.

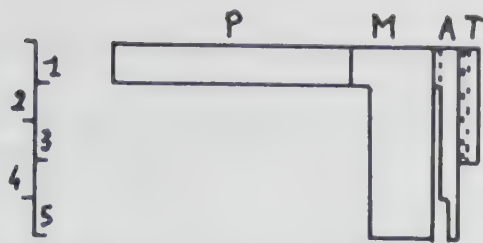
Surtout après 4 ou 5 jours d'immersion, certaines cellules ne présentent qu'un phragmoplaste incomplètement formé ou bien renferment 3 ou 4 noyaux avec des phragmoplastes internucléaires rectilignes ou incurvés le long des noyaux. On note encore des fragmentations, des ponts et des micronoyaux.

En résumé, cette concentration est principalement mitodépressive malgré l'augmentation temporaire des cinèses en 24 heures et détermine des anomalies du fuseau de cytokinèse.

Effet de la concentration $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml

Les racines traitées gagnent 1 mm en 24 heures puis ne s'allongent plus. A partir du 2ème jour, les méristèmes se rétrécissent et s'épaississent.

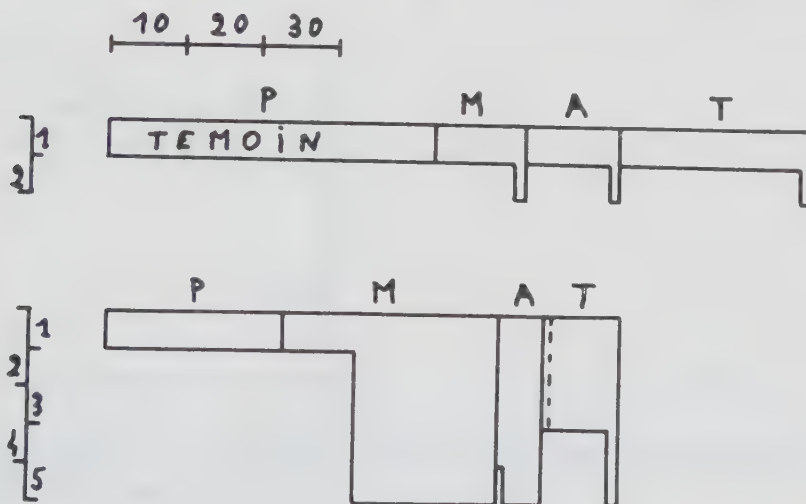
Un effet mitodépresseur s'installe d'emblée. Les déterminations numériques effectuées sur des méristèmes prélevés après 3 heures d'immersion indiquent que la moitié des mitoses ont disparu et que, parmi celles qui restent, on compte 87 % de prophases et de métaphases. L'altération du fuseau achromatique se traduit par des stathmométaphases et des anaphases en étoile ou en hémicinèses. On relève 38 ‰ de cellules binucléées ou à phragmoplaste incomplet. Les chromosomes sont condensés, raccourcis.



GRAPH n° 44 : 6-aminonicotinamide $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 3 heures.

En 24 heures, l'examen microscopique révèle que des noyaux pycnosés envahissent certains méristèmes. En outre, la dépression mitotique est telle que nous avons dû effectuer des numérations totales sur les méristèmes qui n'avaient pas un aspect létal. Nous n'avons trouvé aucune mitose sur l'un alors que l'autre renfermait 72 mitoses dont 26 prophases, 25 métaphases, 8 anaphases, 12 télo-phases sans phragmoplaste et 1 avec des ponts d'agglutination.

Le 2ème jour, la toxicité s'accroît et même quelques méristèmes sont morts. Dans les autres racines, les mitoses sont nombreuses ou en diminution et, de toute façon, toutes en stathmocinèses. Nous avons trouvé des index de 92,42 % et 68,43 % pour chaque type de méristèmes. Les métaphases représentent 40 % des mitoses tandis que les prophases se raréfient. L'inhibition fusoriale qui affecte la plupart des métaphases et les anaphases est soit totale soit partielle. En effet, on relève, à côté de stathmocinèses vraies, d'assez nombreuses images en étoile.



GRAPH n° 45 : 6-aminonicotinamide, $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 48 heures.

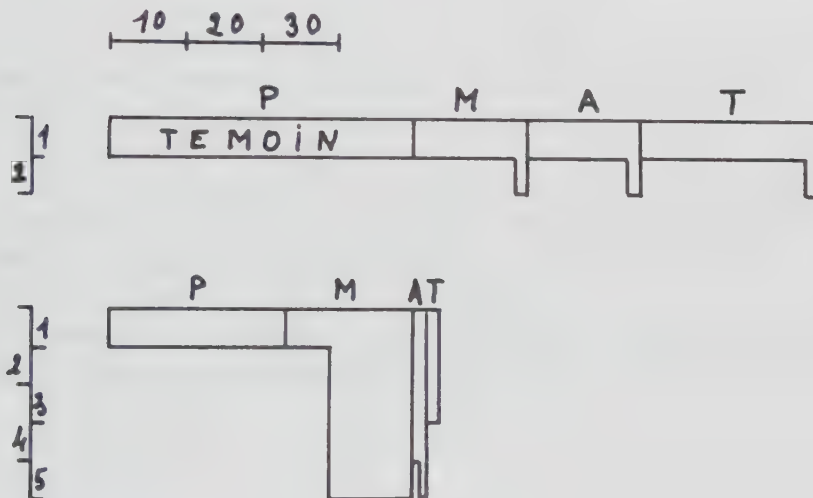
Le 3ème jour, les méristèmes sont morts.

En résumé, l'action mitoclasique se développe mais, en même temps la concentration est létale.

Effet de la concentration $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml

En 3 heures, outre la disparition de 50 % des mitoses, on constate un déséquilibre entre les stades de la division. 95 % des images sont des prophases et des métaphases qui, à elles seules, comptent pour 35 %.

Les métaphases montrent souvent des troubles fusoriaux ; les métaphases normales n'excèdent pas 10 %. Les anaphases sont également très touchées et se trouvent sous forme de stathmoanaphases, d'hémianaphases, d'anaphases lentes. Quelques cellules binucléées peuvent déjà être notées. Quelques noyaux quiescents montrent des nucléoles dilatés.



GRAPH n° 46 : 6-aminonicotinamide, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 3 heures.

En 24 heures, les racines sont translucides, turgescentes et l'aspect cytologique qui correspond à la mort.

En somme, cette concentration est très toxique même après 3 heures d'immersion.

b - Traitement discontinu

Nous serons assez brefs car une concentration seulement s'est révélée intéressante. Nous avons entrepris des traitements d'une heure suivis de retour avec $4 \cdot 10^{-5}$ et $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml. Dans ce cas, aucune anomalie mitotique n'a été notée. Une mitodépression survient au cours du "retour", mais, en 24 heures, tout est redevenu normal.

Si on double la durée du traitement avec ces concentrations, on enregistre l'apparition d'une action mitoclasique faible et l'évolution cytologique est, par ailleurs, identique à celle qui avait été obtenue par 1 heure de traitement.

La concentration $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml a été employée pendant 3 heures, à l'issue desquelles les racines ont été reportées sur milieu normal.

A la fin du traitement, les index sont très abaissés. De nombreuses métaphases sont en stathmocinèses.

Dans les prélèvements de retour, les mitoses disparaissent progressivement et en 4 heures, il ne reste que quelques prophases en régression. En revanche, les cellules binucléées sont abondantes.

La reprise d'une activité mitotique normale se fait à partir de la 7ème heure mais de façon très variable. En effet, une racine ne renferme que 44 mitoses dont 30 prophases en régression et 14 prophases normales tandis qu'une autre racine montre un index de 148,95 ‰ et contient de très nombreuses prophases et métaphases. Nous avons aussi trouvé des valeurs intermédiaires (91,75 ‰) avec un pourcentage considérable de prophases et de métaphases.

Conclusion

Inhibiteur de la croissance radiculaire pour des concentrations inférieures à 10^{-6} mol/ml et inhibiteur du phragmoplaste à partir de $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, l'aminonicotinamide exerce une action mitodépressive, d'abord fugace, puis définitive si la concentration est supérieure à 10^{-5} mol/ml.

Le seuil de toxicité, $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, coïncide également avec l'apparition de l'inhibition fusoriale qui reste, cependant, toujours partielle.

ASSOCIATION COLCHICINE - 6 AMINONICOTINAMIDE

Deux concentrations de colchicine ont été utilisées : $7,5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml et $1,25 \cdot 10^{-7}$ mol/ml. Cette dernière s'est révélée beaucoup trop mitoclasique dès les premières heures du traitement et a empêché l'examen correct de l'association.

Le 6-aminonicotinamide a été employé aux concentrations de $5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, concentration inactive, et de 10^{-5} mol/ml, concentration d'abord mitodépressive puis inactive.

Effet des concentrations Colchicine $7,5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml - 6 Aminonicotinamide

$5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml

Les racines traitées par la colchicine ne montrent pas de troubles mitotiques importants en 3 heures, à l'exception toutefois de très rares anaphases en étoile. Une activité mitoclasique accompagnée d'une faible action chromatoclasique débute en 24 heures, mais les mitoses normales restent nombreuses. Jusqu'au 7ème jour, l'examen microscopique révèle des mitoses normales pour la plupart et quelques cas de stathmocinèses et de polyploïdie.

La croissance des racines est nettement ralentie par rapport au témoin général et les zones méristématiques sont légèrement épaissies.

Les mitoses des racines traitées par l'aminonicotinamide ne subissent pas d'altération pendant toute la durée du traitement. Seules, quelques cellules binucléées, toujours peu abondantes, sont notées en même temps qu'un léger ralentissement de la croissance racinaire.

TABLEAU N° 12

Association Colchicine - 6 aminonicotinamide $5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml

Prélèvement	Colchicine seule	6 amino-nicotinamide seul	Colchicine + 6 aminonico-tinamide
24 heures	16,34 et 22,42	0 et 0	31,25 et 24,52
48 heures	1,80 et 0,96	0 et 0	10,00 et 8,82
4ème jour	5,50 et 6,60	0 et 0	2,83 et 3,80
5ème jour	0,96 et 3,63	0 et 0	0,90 et 7,75
7ème jour	5,17 et 5,45	0 et 0	62,26 et 70,29

Stathmométaphases pour 100 métaphases

Les racines traitées par l'association colchicine-6 aminonicotinamide voient leur croissance pratiquement bloquée dès 48 heures et des tuméfactions subterminales jointes à une constriction au niveau des méristèmes se produisent dans le même temps.

La cytologie suit à peu de choses près celle qui est observée dans les témoins respectifs et c'est seulement le 7ème jour que se déclenche une action mitoclasique intense sous l'influence du traitement combiné. 65 % environ des métaphases sont des stathmocinèses et la présence de nombreuses cellules binucléées et polyploïdes témoigne d'une perturbation des fuseaux de caryocinèse et de cytokinèse.

Effet des concentrations Colchicine $7,5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml - 6 Aminonicotinamide
 10^{-5} mol/ml

Dans les premières heures du traitement par la colchicine seule, les mitoses sont nombreuses et normales malgré quelques plaques métaphasiques plus ou moins bien formées.

Une légère action mitoclasique s'observe en 24 heures mais, dans les prélèvements ultérieurs, les mitoses tendent à revenir à la normale. On note alors des restes de stathmo- et d'hémicinèses visibles sous la forme de cellules polyploïdes et de cellules à noyaux lobés.

Les racines poussent moins bien que les racines témoins et présentent des tuméfactions en chapelet dans la région méristématique à partir du 2ème jour.

Le traitement par l'aminonicotinamide provoque une mitodépression sévère en 3 heures. La majorité des mitoses est constituée de prophases et de télophases normales ou sans phragmoplaste. L'action brutale du composé sur les fins d'anaphases et les débuts de télophases se traduit par des cellules binucléées assez nombreuses, constamment présentes dans les prélèvements suivants.

Les métaphases et anaphases réapparaissent en 24 heures, cependant l'activité mitotique n'est pas complètement restaurée et demeure voisine de 50 % par rapport au témoin général. Le 4ème jour, quelques très rares stathmocinèses apparaissent et les méristèmes commencent à se différencier.

Dès le 2ème jour, la croissance des racines est bloquée et la zone méristématique se rétrécit.

TABLEAU N° 13

Association Colchicine - 6 aminonicotinamide 10^{-5} mol/ml

Prélèvement	Colchicine seule	6 aminonicotinamide seul	Colchicine + 6 aminonicotinamide
24 heures	14, 87 et 8, 03	0 et 0	56, 07 et 62, 74
48 heures	5, 66 et 4, 34	0 -	78, 84 et 79, 43
3ème jour	5, 55 et 4, 71	0 et 0	81, 00 et 74, 54
4ème jour	3, 44 et 3, 73	2, 43 et 0	68, 96 et 86, 95
5ème jour	1, 92 et 3, 80	1, 21 et 1, 86	62, 22 et 76, 92

Stathmométaphases pour 100 métaphases

Les racines traitées par le mélange des 2 composés présentent en 3 heures un aspect cytologique identique à celui du témoin aminonicotinamide.

Une intense activité mitoclasique se développe en 24 heures et se poursuit les jours suivants. On observe à la fois des stathmocinèses, des hémicinèses assez rares, des cellules polyploïdes et des mitoses encore normales. Les déterminations numériques effectuées montrent que, du 2ème au 5ème jour, 75 % environ des métaphases sont des stathmocinèses.

Chaque racine possède une constriction méristématique et la croissance est arrêtée en 24 heures.

De ces expériences, il faut retenir qu'une action mitoclasique explosive prend naissance sous l'influence du traitement combiné même si la colchicine est pratiquement dépourvue d'effet.

2 - Action cytologique de l'Acétylpyridine

Données bibliographiques

A notre connaissance, il n'y a aucune indication bibliographique concernant l'action cytologique de l'acétylpyridine qui, comme le 6 - aminonicotinamide, est un analogue structural de l'amide nicotinique.

En revanche, plusieurs auteurs (33, 99) rapportent les propriétés tératogènes de ce composé chez l'embryon de Poulet et ses propriétés toxiques sur l'animal entier (91). A ces propriétés s'oppose le nicotinamide, alors que l'acide nicotinique et le tryptophanne ne sont efficaces qu'en cas de tératogénèse.

Les effets nocifs de l'acétylpyridine sont encore combattus par le NAD (91). Ce fait prend d'autant plus d'importance que KAPLAN, GOLDIN, HUMPHREYS, CIOTTI et VENDITTI (91) isolent un analogue du NAD : l'acétylpyridine - NAD à partir de tissus tumoraux. KAPLAN et CIOTTI (88) réussissent à montrer que des enzymes du cerveau de Porc et de rate de Boeuf catalysent des réactions d'échange entre NAD et acétylpyridine pour former un analogue de NAD que l'on peut également synthétiser in vitro.

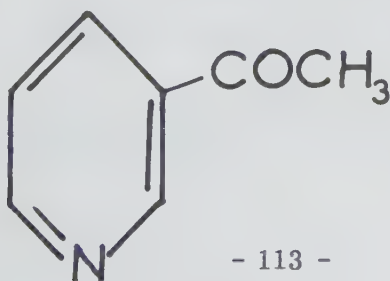
Cependant, rien n'est encore définitivement établi car l'injection d'acétylpyridine à des souris entraîne une augmentation du NAD hépatique et jamais on ne peut identifier l'analogue 3-acétylpyridine - NAD (91, 92).

Même si l'analogue est synthétisé, on a montré qu'il forme des complexes avec les cyanures, le bisulfite et l'hydroxyacétone (88), ce qui le différencie du 6 amino NAD. En outre, on a mis en évidence la possibilité qu'a le NAD modifié de réagir plus ou moins rapidement avec différentes enzymes, la vitesse de réaction étant dans certains cas supérieure à celle de l'homologue naturel (89, 90). Ainsi il est à peu près certain que l'acétylpyridine - NAD ne possède pas les mêmes propriétés que l'amino-NAD.

Néanmoins, CAPLAN, ZWILLING et KAPLAN (33) pensent que l'effet de cette antivitamine reflète une attaque compétitive qui porte sur les réactions dépendantes du NAD ou sur les molécules incorporant le nicotinamide telles que NAD et NADP.

Données expérimentales

Formule :



PM = 121

L'acétylpyridine est une substance liquide, d'odeur faible, jaunâtre, miscible à l'eau en toutes proportions et ne modifie pas le pH du liquide de Knop.

Les concentrations étudiées s'étendent de 10^{-6} mol/ml à $5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml.

a - Traitement continu

Effet de la concentration 10^{-6} mol/ml

Les racines traitées ne présentent jamais d'anomalies morphologiques. Jusqu'au 3ème jour, la croissance est légèrement ralentie puis elle reprend à un rythme identique à celui du témoin. On note quelques cellules binucléées toujours extrêmement rares. Les méristèmes se différencient plus précocement que les méristèmes témoins.

Effet des concentrations 2,5, 5, 7,5. 10^{-6} mol/ml

$7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml est la concentration la plus élevée compatible avec la survie des racines après 7 jours d'immersion. La croissance journalière des racines traitées n'excède pas 1 mm et, au bout d'une semaine, les racines mesurent en moyenne 30 mm contre 90 mm pour le lot témoin.

Dès 24 heures, les racines portent une constriction au niveau du méristème puis des épaisissements sus-méristématiques à partir du 3ème jour. Elles prennent alors une teinte jaune virant au rose le 5ème jour. La différenciation progresse de jour en jour mais n'envahit pas toute la zone méristématique.

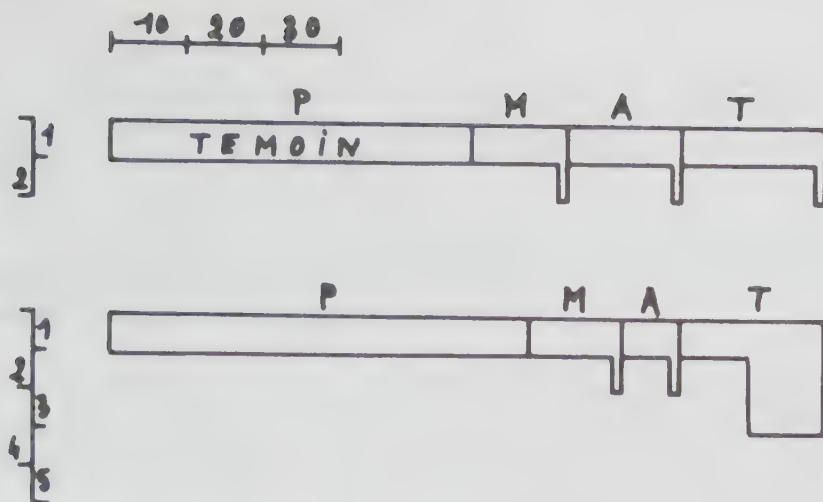
Au cours des prélèvements successifs, l'activité mitotique se révèle essentiellement variable selon les méristèmes dans lesquels on remarque rarement une altération des mitoses en cours. Nous avons compté 10 cellules binucléées pour 1 racine et 33 pour une seconde.

En résumé, ces concentrations agissent surtout sur la croissance et ne perturbent pas la cytologie.

Effet de la concentration 10^{-5} mol/ml

Les racines traitées ne poussent plus à partir du 3ème jour ; elles sont colorées en jaune puis en rose. De jour en jour la différenciation s'accroît.

En 3 heures, la cytologie est pratiquement normale à l'exception de quelques métaphases désorganisées et des télophases sans phragmoplaste.



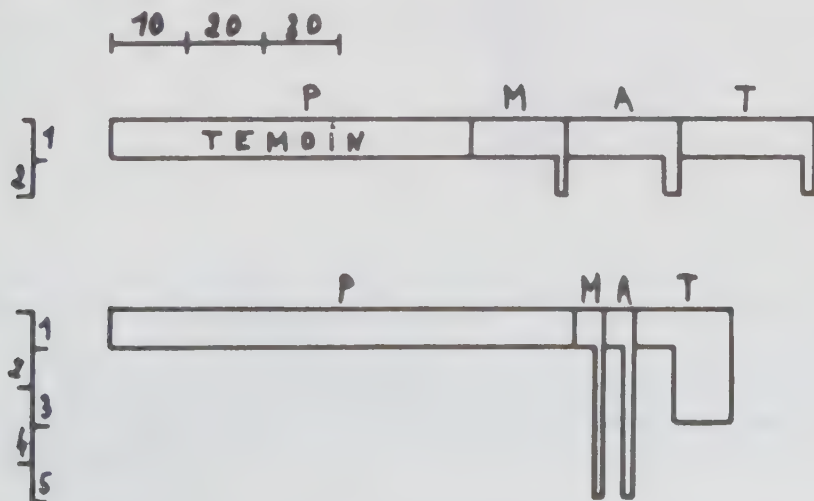
GRAPH n° 47 : Acétylpyridine, 10^{-5} mol/ml, 3 heures

A partir de 24 heures, la mitodépression s'affirme. Cependant les mitoses qui subsistent sont normales, accompagnées de quelques cellules binucléées. Un examen microscopique effectué en fin d'expérience indique un aspect très condensé de la chromatine.

En résumé, cette concentration, mitodépressive, est en outre la concentration-seuil létale.

Effet de la concentration 1,25. 10^{-5} mol/ml

La croissance est arrêtée en 48 heures et la constriction des méristèmes se manifeste en 24 heures. Au point de vue cytologique, on note en 3 heures des métaphases désorganisées et des anaphases en étoile. Toutefois, on remarque les premières stathmométaphases et une proportion anormalement élevée de prophases qui, souvent, sont des images "lâches". L'ensemble prophases-prophases "lâches" constituent 68 % des mitoses.



GRAPH n° 48 : Acétylpyridine, 1,25. 10^{-5} mol/ml, 3 heures.

En 24 heures, les racines commencent à se différencier. La dépression mitotique est alors intense et l'inhibition du phragmoplaste constante chez les télophases.

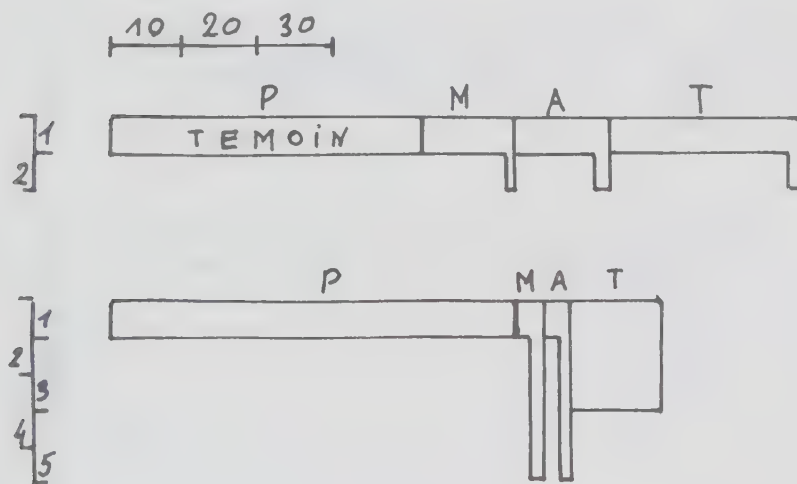
Le 7ème jour, les noyaux au repos sont très condensés. La différenciation du xylème descend profondément vers la pointe radiculaire. La zone méristématique est considérablement rétrécie.

En résumé, c'est avec cette concentration que les premières stathmocinèses apparaissent mais la dépression mitotique est trop intense pour que l'inhibition fusoriale se développe.

Effet de la concentration $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml

L'allongement, ralenti le 1er jour, est bloqué le 2ème jour et les racines portent un rétrécissement méristématique en 24 heures.

L'activité mitotique diminue d'intensité après 3 heures d'immersion. On observe un blocage en prophase. Les stathmométaphases sont un peu plus nombreuses que pour la concentration précédente ainsi que les télophases sans phragmoplaste. Les chromosomes des cellules en mitose apparaissent courts et épais.



GRAPH n° 49 : Acétylpyridine, $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 3 heures.

Dans les prélèvements suivants, la mitodépression devient totale et la lignification avance. Les racines présentent un aspect de mort le 3ème jour mais elles sont turgescentes.

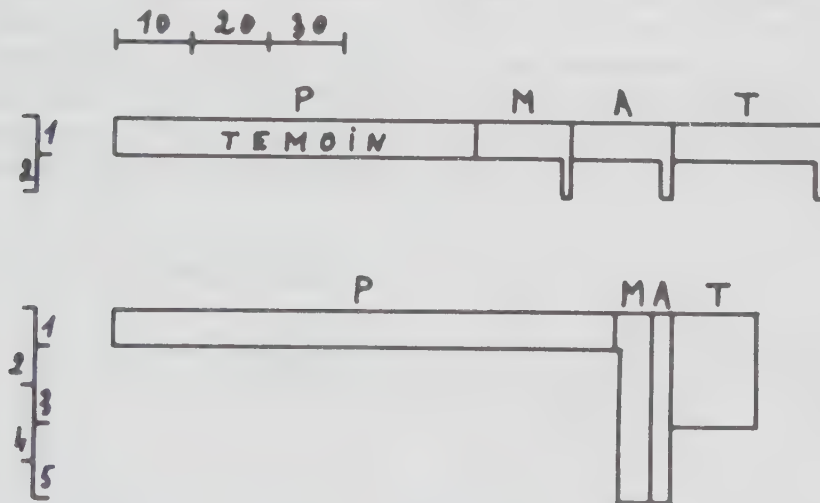
En résumé, des actions identiques à celles qui sont obtenues avec la concentration précédente se produisent mais l'activité mitoclasique est plus intense.

Effet de la concentration $5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml

Les racines, qui ne poussent plus dès 24 heures, présentent une teinte jaune en 48 heures et sont mortes en 3 jours.

Les perturbations cytologiques sont importantes après 3 heures.

Les index mitotiques diminuent légèrement. Les prophases s'accumulent et constituent 85 % environ des mitoses. Parmi ces prophases, plus de la moitié a été dénombré en tant que prophases "lâches". Quant aux métaphases, elles ne sont pas très abondantes. Sur 2 méristèmes issus d'un même bulbe nous avons compté 48 métaphases sur l'un et 71 sur l'autre. Toutes sont des stathmocinèses. Les anaphases sont souvent en étoile et les télophases dépourvues de cloisons. Quelques manifestations chromatoclasiques se produisent : ponts et fragmentations. Les chromosomes ont une silhouette courte et trapue.



GRAPH n° 50 : Acétylpyridine $5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 3 heures.

En 24 heures, de nombreuses cellules binucléées sont détectées mais les noyaux quiescents sont altérés. Toutes les cinèses ont disparu. Les vaisseaux du xylème s'enfoncent profondément dans l'extrémité méristématique.

Après 48 heures d'immersion, les racines prennent une teinte jaune. Le 3ème jour, elles sont flaccides et translucides.

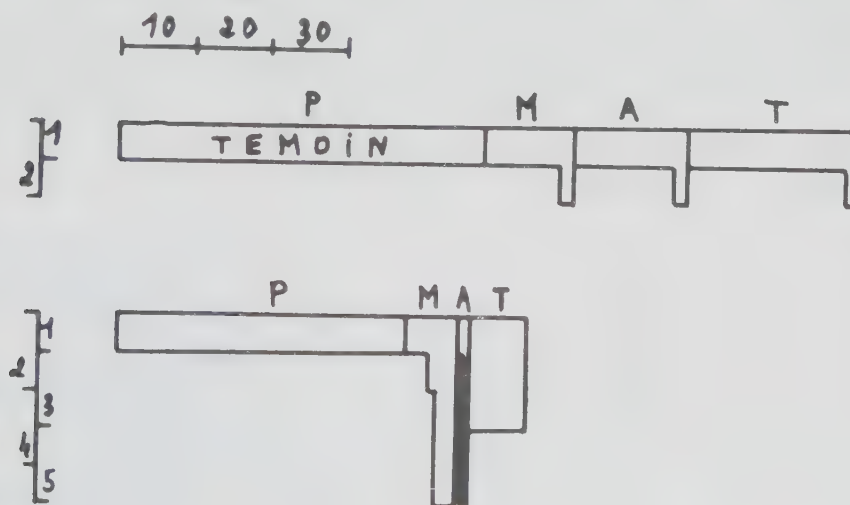
En résumé, l'inhibition fusoriale, totale sur les métaphases, s'accompagne d'une légère mitodépression mais la concentration est rapidement toxique.

b - Traitement discontinu

Nous serons brefs à ce sujet car les concentrations essayées n'ont donné que peu de résultats intéressants.

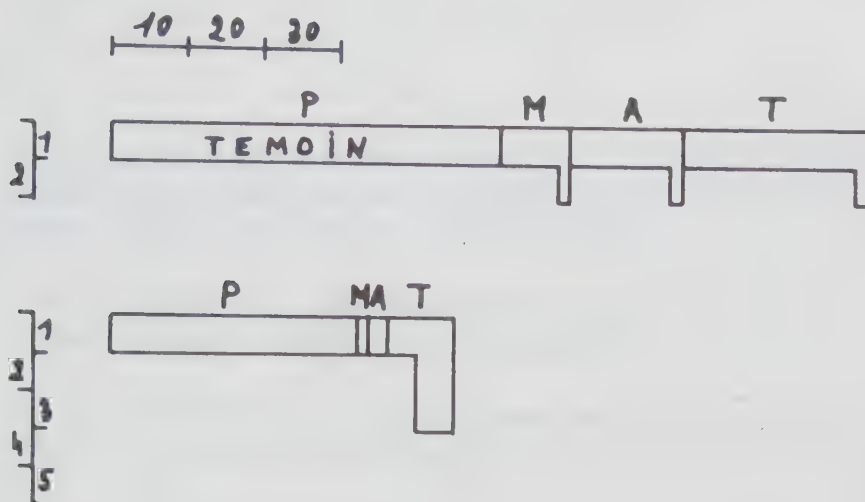
Effet de la concentration 10^{-4} mol/ml

A l'issue du traitement d'une heure, on remarque une forte disproportion entre les différents stades de la mitose ainsi qu'une chute de 50 % de l'index mitotique. Les prophases sont normales, mais certaines d'entre elles sont "lâches" ou bien tendent à retourner à l'état interphasique. L'ensemble prophases normales, prophases en régression, prophases "lâches" représente 78 % des mitoses en cours. Les métaphases sont, pour la plupart, désorganisées ou en stathmocinèses. Les anaphases peuvent disparaître complètement ou elles ne représentent que 2 % des cinèses au maximum. Les cellules binucléées et les cellules à phragmoplate incomplet ne sont pas fréquentes. Une action toxique et chromatoclasique se traduit par des mitoses agglutinées et des ponts d'agglutination.



GRAPH n° 51 : Acétylpyridine, 10^{-4} mol/ml, 1 h Traitement

Deux heures après l'interruption du traitement, on observe toujours le blocage prophasique, tandis qu'on note une légère augmentation du nombre d'anaphases. Par contre les métaphases sont réduites à 2 % des mitoses. L'inhibition du fuseau de cytokinèse entraîne une légère augmentation de cellules binucléées. Nous avons relevé, en outre, 2 ou 3 cas de stathmodiérèses et quelques micronoyaux.



GRAPH n° 52 : Acétylpyridine, 10^{-4} mol/ml, 2 h Retour

Après 3 heures sur liquide de Knop, les effets toxiques s'aggravent. Les noyaux sont souvent condensés et pycnotiques surtout pour les cellules binucléées et les télophases agglutinées. Les numérations totales effectuées donnent les résultats suivants :

	Méristème 1	Méristème 2
Nombre total de mitoses	159	279
Prophases normales	69	64
" lâches	20	43
" en régression	46	54
Métaphases normales	11	42
" désorganisées	6	16
" en étoile		1
Anaphases normales	7	17
" "lentes"	5	11
" en étoile		1
Télophases normales	3	12
" sans phragmo.	3	13
" à phragmo. incomplet		5

En 4 heures, les résultats ne sont pas tellement différents.

Vingt-quatre heures après la mise en "retour", une activité mitotique normale reprend son cours. Les index sont respectivement de 126,45 et 122,10 ‰. La proportion de chaque phase de la mitose est semblable à celle du témoin. Il est assez fréquent de rencontrer des cellules binucléées en mitose : "doubles" prophases, métaphases, anaphases.

Conclusion

Le ralentissement de la croissance radiculaire se manifeste à 10^{-6} mol/ml et s'accompagne d'une différenciation du xylème, toujours beaucoup plus accentuée dans les racines traitées que dans les racines témoins.

L'acétylpyridine est mitodépresseur à $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, concentration également responsable de l'inhibition du phragmoplaste.

Les premières stathmocinèses apparaissent à $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/ml et deviennent de plus en plus nombreuses au fur et à mesure que les concentrations s'élèvent.

Si le traitement est limité à 1 heure avec 10^{-4} mol/ml, l'inhibition fusoriale est faible mais réversible.

ASSOCIATION COLCHICINE - ACÉTYLPYRIDINE

L'acétylpyridine ne renforce pas les propriétés mitoclasiques de la colchicine. On observe en effet une activité mitoclasique aussi intense dans les sujets témoins que dans les sujets soumis à l'association lorsque la colchicine est employée à des concentrations légèrement mitoclasiques.

3 - Action cytologique de la Galactoflavine

Selon DEYSSON, le mélange amide nicotinique et riboflavine s'oppose à l'inhibition fusoriale consécutive à l'administration de la colchicine et l'activité des vitamines est due, pour une grande part, à l'amide nicotinique. De là, on le sait, est tirée l'hypothèse que l'alcaloïde bloque le transport d'hydrogène.

Nous avons pensé qu'un argument décisif concernant l'apparition de stathmocinèses sous l'influence du blocage du transport d'hydrogène serait fourni par l'obtention d'un effet mitoclasique à la suite du traitement des cellules par les anti-vitamines associées alors que la galactoflavine, seule, serait inactive et que nous savons déjà que l'aminonicotinamide est mitoclasique.

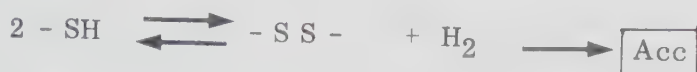
Des essais préliminaires avec la galactoflavine démontrent que ce produit, comme nous nous y attendions, n'entraîne pas d'anomalie fusoriale aux concentrations que nous avons utilisées.

Ensuite, l'inhibiteur de la riboflavine a été associé au 6 aminonicotinamide à raison de 25 mg pour 100 g de galactoflavine et de 171 mg pour 100 g d'aminonicotinamide pour une première expérience et de 50 mg pour 100 g et de 137 mg pour 100 g pour une seconde expérience. Seule, l'activité mitotique est légèrement réduite par l'association. Aucun autre trouble n'a été observé.

Pensant que les antivitamines seraient susceptibles de renforcer l'effet mitoclasique de la colchicine, nous avons effectué un essai d'association triple, mais là encore, aucun effet probant n'a pu être mis en évidence.

DISCUSSION

A l'aide de composés convenablement choisis, nous avons provoqué la rupture de l'équilibre de la réaction d'oxydoréduction thiol-disulfure, grâce à laquelle s'effectue vraisemblablement l'enchaînement des sous-unités de microtubules, et modifié l'effet mitoclasique de la colchicine. Nous essaierons, d'abord, de dégager les conséquences de cette rupture et nous tenterons, ensuite, d'établir les rapports de la colchicine avec la réaction d'oxydoréduction



I - CONSEQUENCES DE LA RUPTURE DE L'EQUILIBRE THIOL-DISULFURE

A - En traitement continu

Tous les composés que nous avons étudiés, excepté les inhibiteurs des groupes - SH, bloquent la mitose en empêchant le déroulement de la prophase et se comportent, en fin de compte, comme des agents mitodépresseurs et mitostatiques. Toutes les mitoses ont disparu des méristèmes lorsque la mort survient.

Les réactifs des thiols, N-éthylmaléimide et hydroxyde de phénylmercure, ont une action qui se caractérise par le passage brusque d'une concentration totalement inactive à une concentration rapidement mortelle. L'entrée en prophase se fait normalement. Lorsque la mort se produit, des mitoses fixées sont visibles.

Ils sont tous dotés d'une activité mitoclasique, plus ou moins intense, qui ne se manifeste que pour des concentrations élevées, le plus souvent létales.

En raison de la toxicité des concentrations responsables de l'inhibition fusoriale et de la mitodépresseion, nous préférons comparer les actions d'après les premiers signes de leur manifestation et non pas d'après leur pleine expression.

I - Comparaison des activités mitodépressives

	Les 1ers signes de mitodépression apparaissent pour	en	ces concentrations sont létales en :
N E M	$5. 10^{-8}$ mol/ml soit 0, 625 mg %	24 h.	4 jours
P O H	$2, 5. 10^{-9}$ mol/ml " 0, 074 mg %	24 h.	exceptionnellement en 3 jours
M E	$2, 5. 10^{-9}$ mol/ml " 19, 5 mg %	24 h.	7 jours
D T E	$5. 10^{-7}$ mol/ml " 7, 70 mg %	72 h.	7 jours si la solution est renouvelée
D T D G	$2. 10^{-6}$ mol/ml " 31, 20 mg %	48 h.	6 jours
6 A N	10^{-6} mol/ml " 13, 70 mg %	4 jours	non létale
A P	$7, 5. 10^{-6}$ mol/ml " 90, 75 mg %	3 jours	non létale

Les produits les plus mitodépresseurs sont l'hydroxyde de phénylmercure et le N-éthylmaléimide et c'est l'acétylpyridine, inhibiteur de l'amide nicotinique, qui a l'activité la plus faible.

Pour obtenir un effet comparable à celui de l'hydroxyde de phénylmercure, il faut en molécules :

20 fois plus de N-éthylmaléimide
 1000 fois plus de Mercaptoéthanol
 200 fois plus de Dithioérythritol et une durée de traitement x 3
 800 fois plus de Dithiodiglycol et une durée de traitement x 2
 400 fois plus de 6 Aminonicotinamide et une durée de traitement x 4
 3000 fois plus de 3 Acétylpyridine et une durée de traitement x 3

On peut également remarquer que seuls l'aminonicotinamide et l'acétylpyridine sont mitodépresseurs pour des concentrations non mortelles.

2 - Comparaison des activités toxiques

	Les lères concentrations létales sont	en	et sont également
N E M	$5. 10^{-8}$ mol/ml soit 0, 625 mg %	4 jours	. mitodépressive . inhibitrice de la croissance . non mitoclasique . non chromatoclasique
P O H	$2, 5. 10^{-9}$ mol/ml soit 0, 074 mg %	3 jours variable	. mitodépressive . inhibitrice de la croissance . mitoclasique . chromatoclasique
M E	$2, 5. 10^{-6}$ mol/ml soit 19, 5 mg %	7 jours	. mitodépressive . inhibitrice de la croissance . non mitoclasique . non chromatoclasique
D T E	$5. 10^{-7}$ mol/ml soit 7, 70 mg %	7 jours si les solutions sont renouvelées	. mitodépressive . inhibitrice de la croissance . non mitoclasique . non chromatoclasique
D T D G	$2. 10^{-6}$ mol/ml soit 31, 20 mg %	6 jours	. mitodépressive . inhibitrice de la croissance . non mitoclasique . non chromatoclasique
A N	$2, 5. 10^{-5}$ mol/ml soit 342 mg %	3 jours	. mitodépressive . inhibitrice de la croissance . mitoclasique . chromatoclasique
A P	10^{-5} mol/ml soit 121 mg %	7 jours	. mitodépressive . inhibitrice de la croissance . non mitoclasique . non chromatoclasique

L'hydroxyde de phénylmercure est le composé le plus toxique et il est en 3 jours au moins :

20 fois plus toxique que le N-éthylmaléimide

1000 fois	"	"	"	Mercaptoéthanol
200 fois	"	"	"	Dithio érythritol
800 fois	"	"	"	Dithiodiglycol
10000 fois	"	"	"	l'Aminonicotinamide
4000 fois	"	"	"	l'Acétylpyridine

Par ordre croissant de toxicité, les antivitamines sont suivies du dithiodiglycol, des composés sulphydrylés et des inhibiteurs des groupements thiols.

A la concentration létale, la **dépression** mitotique est générale ainsi que l'inhibition de croissance. C'est pour des concentrations supérieures que tous les produits, sauf l'hydroxyde de phénylmercure et l'aminonicotinamide, exercent une activité mitoclasique et chromatoclasique.

3 - Comparaison des activités mitoclasiques

a - Premiers signes d'inhibition fusoriale.

	Les 1ers signes d'inhibition fusoriale apparaissent pour	en :	ces concentrations sont létales en :
N E M	-	-	-
P O H	2, 5. 10 ⁻⁹ mol/ml soit 0, 074 mg %	24 h. variable	3 jours variable
M E	4. 10 ⁻⁵ mol/ml " 312 mg %	3 h.	48 heures
D T E	5. 10 ⁻⁶ mol/ml " 77 mg %	3 h.	48 heures
D T D G	4. 10 ⁻⁶ mol/ml " 62, 4 mg %	24 h.	6 jours
A N	7, 5. 10 ⁻⁶ mol/ml " 102, 75 mg %	3 jours	non létale
A P	1, 25. 10 ⁻⁵ mol/ml " 151 mg %	3 jours	7 jours

A une molécule d'hydroxyde de phénylmercure correspondent :

16.000	molécules de	Mercaptoéthanol
2.000	"	" Dithioérythritol
1.600	"	" Dithiodiglycol
3.000	"	" 6-aminonicotinamide
5.000	"	" 3-acétylpyridine

Le N-éthylmaléimide se distingue de l'hydroxyde de phénylmercure par une action mitoclasique décelable après des traitements brefs suivis de retour.

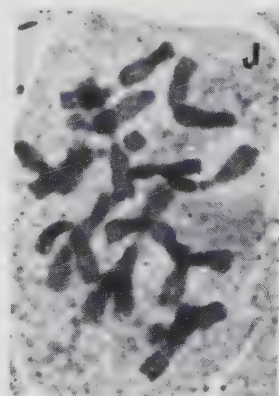
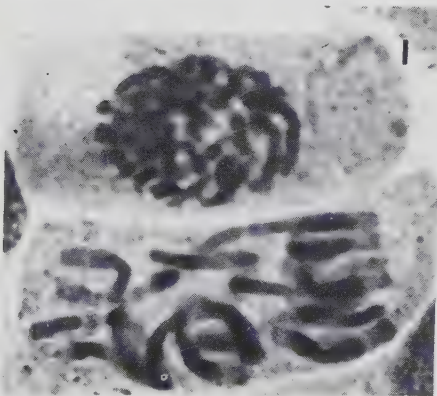
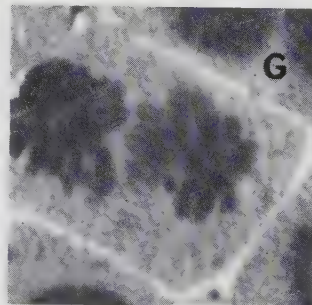
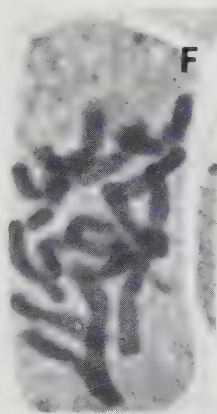
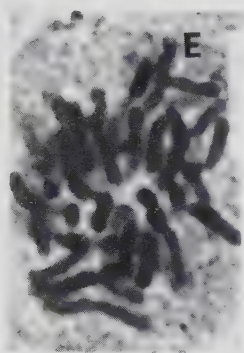
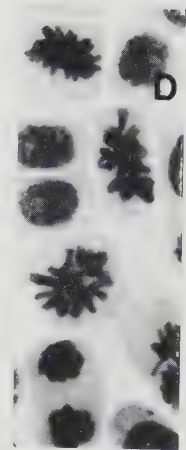
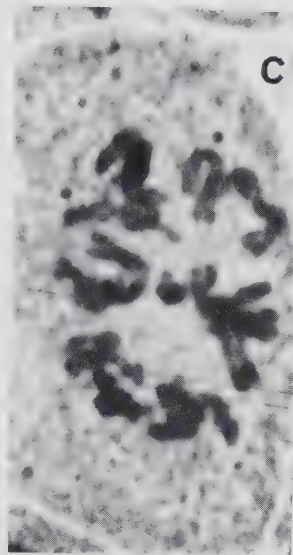
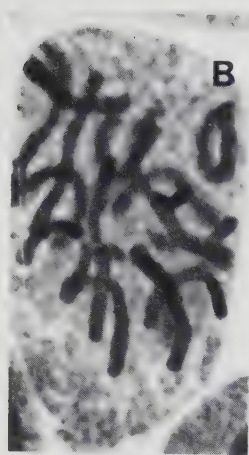


PLANCHE 4

- Photos A et F : action du dithioérythritol, $7,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 1 heure de traitement, 24 heures retour : "double" télophase (A) et stathmométaphase (F).
- Photos B et I : action du dithiodiglycol, $2 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 6 heures (B) et 3 heures (I) : stathmométaphase. Remarquer un chromosome enroulé (B) - Stathmométaphase et prophase en régression (I).
- Photos C et G : Action de l'acétylpyridine, $5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 3 heures : stathmométaphase à chromosomes contractés (C) et télophases sans phragmoplaste (G).
- Photos D, J et K : action du 6-aminonicotinamide, $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 3 heures (D et J) et 48 heures (K) : action mitotique (D), stathmométaphase (J), stathmo-anaphase (K).
- Photo E : action du dithioérythritol, 10^{-5} mol/ml, 6 heures : métaphases désorganisées.
- Photo H : action du 6-aminonicotinamide, $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/ml, 24 heures : nombreuses métaphases normales.
-

Les effets du mercaptoéthanol et du dithioérythritol sont moins marqués que ceux du dithiodiglycol. L'aminonicotinamide est la plus puissante des antivitaminés. En somme, le blocage des thiols surpasse en efficacité la modification du rapport thiol-disulfure et la carence vitaminique.

b - Comparaison des concentrations responsables d'une action mitoclasique maximale.

	Action stathmométaphasique totale obtenue en 3 heures pour	Maximum de stathmocinèses (méta, ana et télophases) obtenu pour	Caractéristique de l'inhibition fusoriale	La mort survient en
N E M	Uniquement en retour $5. 10^{-7}$ mol/ml soit 6,25 mg %	en retour $5. 10^{-7}$ mol/ml	complète en 4 h de retour	3 jours
P O H	$5. 10^{-9}$ mol/ml soit 0,148 mg %	$7,5. 10^{-9}$ mol/ml soit 0,222 mg %	complète en 3 heures	<24 heures
M E	-	$4. 10^{-5}$ mol/ml soit 312 mg %	incomplète en 6 heures et plus	<48 heures
D T E	-	10^{-5} mol/ml soit 77 mg %	incomplète en 6 h. et plus	<24 heures
D T D G	$2. 10^{-5}$ mol/ml soit 312 mg %	$2. 10^{-5}$ mol/ml soit 312 mg %	incomplète en 3 h. et plus	<24 heures
A N	-	$4. 10^{-5}$ mol/ml soit 548 mg %	incomplète en 3 h. et plus	<24 heures
A P	-	$5. 10^{-5}$ mol/ml soit 605 mg %	incomplète en 3 h. et plus	<48 heures

Nous entendons par inhibition fusoriale maximale la quantité de stathmocinèses vraies à l'exclusion des métaphases désorganisées et des télophases sans phragmoplaste.

Au niveau des métaphases, seuls l'hydroxyde de phénylmercure et le dithiodiglycol sont capables d'inhiber complètement le fuseau. Cependant, il est clair que la spécificité d'action de ces produits sur l'appareil fusorial n'égale pas celle de la colchicine car leur effet mitoclasique n'est qu'exceptionnellement total et, de toute façon, ne s'exerce que pour des concentrations rapidement létales.

L'inhibition de la synthèse des fibres fusoriales n'apparaît donc pas comme l'effet primaire de ces composés. C'est pourquoi, la durée de traitement ne doit pas excéder 6 heures pour que les anomalies obtenues soient significatives.

c - Comparaison de la sensibilité des fibres fusoriales à l'égard des produits étudiés et de la colchicine

Toutes nos expériences ont été effectuées en pièce climatisée et, dans ces conditions, les premières altérations fusoriales se manifestent pour $7,5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml, soit 3 mg pour 100.

	La concentration seuil mitoclasique est	en	Cette concentration est létale en :
Colchicine	$7,5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml soit 3 mg %	24 heures	Jamais mortelle. L'activité tend à s'atténuer après 24 h.
N E M	-	-	-
P O H	$2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml soit 0,074 mg %	24 heures variable	3 jours variable
M E	$4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml soit 312 mg %	3 heures	48 heures
D T E	$5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml soit 77 mg %	3 heures	48 heures
D T D G	$4 \cdot 10^{-6}$ mol/ml soit 62,4 mg %	24 heures	6 jours
A N	$7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml soit 102,75 mg %	3 jours	non létale
A P	$1,25 \cdot 10^{-5}$ mol/ml soit 151 mg %	3 heures	7 jours

L'apparition des premières stathmocinèses a lieu avec :

	1 partie de colchicine
0,033 "	d'hydroxyde de phénylmercure
546 "	de mercaptoéthanol
66 "	de dithioérythritol
53 "	de dithiodiglycol
100 "	de 6 aminonicotinamide
166 "	d'acétylpyridine

En résumé, les inhibiteurs des groupes - SH provoquent les perturbations les plus nettes aux concentrations les plus faibles.

Le dithioérythritol et le dithiodiglycol sont plus mitodépresseurs, plus toxiques et plus mitoclasiques que les antivitamines. Le mercaptoéthanol, en revanche, est moins mitoclasique.

Tous, sauf l'hydroxyde de phénylmercure, sont considérablement moins actifs que la colchicine et, de plus, ils ne possèdent pas une grande spécificité d'action sur le fuseau. Le N-éthylmaléimide se singularise pour une action mitoclasique décelable uniquement en retour.

B - Traitement discontinu

Dans la mesure du possible, nous avons limité à 1 heure l'immersion des racines dans les solutions de produit à essayer pour faciliter la comparaison avec les effets de la colchicine produits dans les mêmes conditions.

Nous avons, cependant, dû réduire ce temps à 10 minutes pour le N-éthylmaléimide, seul temps compatible avec l'apparition d'une action mitoclasique totale.

L'hydroxyde de phénylmercure et le dithiodiglycol bloquent les métaphases en stathmocinèses, mais, si la durée du traitement avant la mise en retour est allongée à 3 heures, l'effet mitoclasique se généralise puis s'estompe rapidement pour le dithiodiglycol, plus lentement pour l'organomercurel.

Tous les autres composés ne donnent lieu qu'à un effet partiel, excepté les antivitamines toujours inactives.

Une dépression mitotique succède généralement aux anomalies fusoriales. La durée de la mitostase est très variable et est souvent précédée d'une accumulation de prophases dont certaines retournent à l'état interphasique.

Après 24 heures de vie sur liquide de Knop, toutes les cinèses sont redevenues normales.

En somme, ces composés se différencient de la colchicine par une inhibition fusoriale souvent incomplète, par l'installation d'une période de mitostase plus ou moins étendue et par une spécificité moindre.

C - Comparaison des inhibiteurs des groupements thiols

Le N-éthylmaléimide inhibe la croissance radiculaire même à des concentrations non mortelles, 10^{-9} mol/ml, ce qui s'accorde avec son activité antiauxinique (189), tandis que l'organomercurel ne bloque l'allongement qu'à des concentrations létales.

Les concentrations-seuils toxiques sont $5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml pour le N - éthylmaléimide et $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml pour l'hydroxyde de phénylmercure. Pour ce dernier, RAMEL (150) trouve $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol/ml en 72 heures sur A. Cepa alors que nous n'avons jamais observé de résistance cellulaire au delà de 48 heures avec $5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml et au delà de 3 heures avec $2,5 \cdot 10^{-7}$ mol/ml sur A. Sativum. Cependant, pour d'autres organomercuriels, FISKESJO (63) situe les seuils de toxicité entre $5 \cdot 10^{-9}$ et 10^{-8} mol/ml, également sur A. Cepa.

L'effet radiomimétique survient pour 10^{-7} mol/ml pour le N-éthylmaléimide et à partir de $2,5 \cdot 10^{-10}$ mol/ml pour l'organomercurel, concentration pour laquelle les résultats de RAMEL et de FISKESJO sont concordants. Selon le composé, la manifestation de la chromatoclasie procède d'effets différents. Intimement liée à la toxicité générale pour le N - éthylmaléimide, elle ne se traduit que par des agglutinations de la chromatine pour des concentrations rapidement mortelles. L'hydroxyde de phénylmercure exerce un effet chromatoclasique vrai responsable de fragmentations. A ce propos, la fixation des organomercuriels sur l'A D N , démontrée *in vivo* pour l'hydroxyde de méthylmercure (70), pourrait expliquer l'activité de ces produits au niveau des chromosomes mais il n'est pas prouvé que la chromatoclasie est vraiment la conséquence de ce phénomène.

La concentration-seuil mitoclasique, pour le dérivé mercuriel, se trouve aux environs de $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml sur A. Sativum et vers $8 \cdot 10^{-10}$ mol/ml sur A. Cepa (150). FISKESJO la situe vers $2 \cdot 10^{-9}$ mol/ml. Au voisinage de cette zone seuil, tout le monde est unanime à dénoncer l'extrême variabilité de l'aspect cytologique allant des cinèses rigoureusement normales aux stathmocinèses avec tous les intermédiaires.

Enfin, nous rappellerons que le N-éthylmaléimide inhibe la formation de l'appareil fusorial uniquement pour des traitements brefs suivis de retour tandis que l'hydroxyde de phénylmercure possède ces propriétés à la fois en continu et en retour.

En ce qui concerne le dérivé mercuriel, il est probable que les différences que nous avons constatées entre les résultats de RAMEL et les nôtres proviennent du matériel et des méthodes de comptage. Nos résultats sont exprimés par méristème alors que RAMEL totalise les cellules de plusieurs méristèmes sans tenir compte des variations de sensibilité individuelle propre à chaque racine.

Pour ces inhibiteurs, il est remarquable de constater qu'il n'y a pas de transition entre une concentration totalement inactive et une concentration rapidement mortelle. Ce phénomène suggère qu'une concentration-seuil en inhibiteurs existe au-dessus de laquelle tous les thiols cellulaires sont saturés et au-dessous de laquelle la saturation partielle est compatible avec un comportement normal de

la mitose. En somme, la possibilité d'une réaction stoechiométrique unique, se déroulant in vivo entre les thiols et les inhibiteurs, ne doit pas être exclue a priori. Il faut, cependant, observer la plus grande prudence car les thiols cellulaires, aussi bien catalytiques que structuraux, ne sont pas tous immédiatement accessibles à leurs réactifs et, vraisemblablement, ne réagissent pas aussi rapidement avec le N - éthylmaléimide qu'avec l'hydroxyde de phénylmercure ou inversement. En outre, ces produits ne sont pas absolument spécifiques des thiols et leurs effets résulteraient d'une action mixte s'exerçant à la fois sur les - SH et sur autre chose.

Si on limite l'inhibition fusoriale au blocage des - SH, la question se pose de savoir si ces inhibiteurs sont stathmocinétisants en empêchant directement la polymérisation des protéines sulfhydrylées ou s'ils ne le sont qu'indirectement en s'associant à des - SH non structuraux mais essentiels pour l'initiation de ce processus par une voie enzymatique.

En fait, le problème ne peut pas être résolu définitivement, car il ne faut pas négliger la très large distribution ni le rôle extrêmement important des - SH dans de nombreuses voies métaboliques.

Le blocage des thiols déprime le fonctionnement des ribosomes et entraîne une inhibition de la synthèse des protéines (183) car, dans ces conditions, les ribosomes et les phénylalaninyl - t A R N et lysyl-t A R N ne peuvent plus se combiner (111). La synthèse des protéines microtubulaires serait ainsi inhibée.

Le blocage des - SH perturbe également la respiration, processus qui exige l'intervention de thiols catalytiques. Cette atteinte respiratoire s'accompagne d'une diminution des phosphorylations donc d'un déficit en A.T.P. Sans préjuger du rôle de l'A.T.P., on peut dire que le déroulement de la division cellulaire exige un apport énergétique (128). En effet, on a montré que la mitose était bloquée lorsque la teneur de la cellule en A.T.P. s'abaissait au-dessous de 50 % de sa valeur normale, et il est alors compréhensible que l'abaissement progressif de la production d'énergie par les inhibiteurs des - SH retentisse sur la division cellulaire et en empêche la réalisation. Ces composés se comporteraient donc également comme des inhibiteurs de la respiration (36, 193).

En somme, le mécanisme "thioloprive" de ces composés altère de nombreux processus et semble s'exercer indistinctement sur les thiols structuraux ou enzymatiques, justifiant ainsi leur manque de spécificité sur l'appareil fusorial.

D - Comparaison des dérivés sulfures

L'interprétation des résultats obtenus avec le mercaptoéthanol, le dithioérythritol et le dithiodiglycol pose quelques problèmes en raison même des caractéristiques de ces groupements. A l'oxydabilité des - SH correspond la réductibilité des - S - S -. Ces produits sont, en plus, capables théoriquement de modifier le potentiel Redox du milieu où ils sont introduits.

Autrement dit, dès qu'ils ont pénétré dans la cellule, sont-ils ou non transformés en une forme unique, thiol ou disulfure ? Leur action est-elle effectivement due à la présence du groupe - SH ou - S - S - ou bien n'est-elle qu'une conséquence de la modification du potentiel Redox ?

D'une part, OLCOTT (142), MAZIA (124) et CLELAND (35) recommandent l'emploi du mercaptoéthanol et du dithioérythritol en raison de leur faible tendance à l'autooxydation. En revanche, BRACHET et ses collaborateurs (24) démontrent que le mercaptoéthanol en solution subit, en 24 heures, une autooxydation de l'ordre de 60 %.

D'autre part, l'identification dans les cellules d'une "protein disulfide reductase" (141), d'une glutathion-réductase à NADP (141), d'une cystine-réductase à NAD (141) et d'une disulfure-réductase à NADP (185) (qui réduit aussi bien la cystine que l'acide lipofique et que le dithiodiglycol), semble être en faveur de la réduction des disulfures.

Personnellement, à l'issue d'un traitement avec des concentrations faibles de mercaptoéthanol et de dithioérythritol, nous avons constaté la disparition des mitoses puis, après quelque temps, leur réapparition en plus grand nombre. Si on prend la précaution de renouveler les solutions tous les jours, l'activité mitotique diminue progressivement et ne revient jamais à la normale. Ce phénomène semble prouver l'autooxydation des composés sulfhydrylés dans les conditions de nos expériences.

De l'antagonisme exercé vis-à-vis de la colchicine à la fois par le mercaptoéthanol et le dithiodiglycol, nous pouvons conclure que, si on obtient un résultat identique en employant indifféremment le composé réduit ou oxydé, il y a transformation de l'un dans l'autre. Etant donné que les concentrations utilisées sont faibles et que le mercaptoéthanol paraît, dans ces conditions, légèrement autooxydable, il est logique de penser à la production de dithiodiglycol à partir du mercaptoéthanol.

Mais l'inactivité du dithioérythritol, qui est un dithiol, vis-à-vis de la colchicine se porte à l'encontre de cette interprétation et indique que la protection exercée par les - SH contre l'effet mitoclasique de l'alcaloïde n'est pas généralisable non plus d'ailleurs que la protection exercée par les - S - S - puisque le chlorhydrate de cystamine est inactif.

Enfin, le renforcement des propriétés mitoclasiques du dithiodiglycol par le mercaptoéthanol semblerait prouver que les 2 produits agissent après transformation mutuelle.

Cependant, si le mercaptoéthanol est oxydé en dithiodiglycol, l'action cytologique obtenue par l'association des 2 composés devrait correspondre à celle qui est provoquée par la même concentration de dithiodiglycol augmentée de la concentration en disulfures résultant de l'oxydation du mercaptoéthanol. Le même raisonnement s'applique dans le cas où le dithiodiglycol serait réduit en mercaptoéthanol.

Autrement dit, qu'il y ait oxydation ou réduction, l'effet de l'un devrait être renforcé par l'autre.

Or, dans les conditions de nos expériences, nous constatons que le mercaptoéthanol renforce les propriétés du dithiodiglycol tandis que l'inverse n'est pas vrai. Doit-on alors admettre que ces composés agissent chacun sous leur forme propre ? Ou bien, cela signifie-t-il qu'ils se transforment l'un dans l'autre mais que l'oxydation des - SH est plus aisée que la réduction des - S - S - ?

Quoiqu'il en soit, si on admet la transformation des - SH en - S - S, et inversement, et si l'action de ces composés est vraiment due à la présence des - SH et des - S - S -, la comparaison des effets provoqués par le mercaptoéthanol, le dithioérythritol et le dithiodiglycol devrait se traduire par des rapports de concentrations

$$\frac{ME}{DTDG} = 2 ; \quad \frac{ME}{DTE} = 2 ; \quad \frac{DTE}{DTDG} = 1$$

iers signes de manifestation de la :	$\frac{ME}{DTDG}$	$\frac{ME}{DTE}$	$\frac{DTE}{DTDG}$
mitodépression	$\frac{2,5 \cdot 10^{-6}}{2 \cdot 10^{-6}} = 1,25$	$\frac{2,5 \cdot 10^{-6}}{5 \cdot 10^{-7}} = 5$	$\frac{5 \cdot 10^{-7}}{2 \cdot 10^{-6}} = 0,25$
chromatoclasie	$\frac{5 \cdot 10^{-5}}{10^{-5}} = 5$	$\frac{5 \cdot 10^{-5}}{5 \cdot 10^{-6}} = 10$	$\frac{5 \cdot 10^{-6}}{10^{-5}} = 0,5$
toxicité	$\frac{2,5 \cdot 10^{-6}}{2 \cdot 10^{-6}} = 1,25$	$\frac{2,5 \cdot 10^{-6}}{5 \cdot 10^{-7}} = 5$	$\frac{5 \cdot 10^{-7}}{2 \cdot 10^{-6}} = 0,25$
inhibition de croissance	$\frac{2,5 \cdot 10^{-6}}{10^{-6}} = 2,5$	$\frac{2,5 \cdot 10^{-6}}{5 \cdot 10^{-8}} = 50$	$\frac{5 \cdot 10^{-8}}{10^{-6}} = 0,05$
mitoclasie	$\frac{4 \cdot 10^{-6}}{4 \cdot 10^{-6}} = 1$	$\frac{4 \cdot 10^{-6}}{5 \cdot 10^{-6}} = 0,8$	$\frac{5 \cdot 10^{-6}}{4 \cdot 10^{-6}} = 1,25$

Il ressort de ce tableau que le dithioérythritol est en général plus actif que le dithiodiglycol et que le mercaptoéthanol, et qu'il est impossible de mettre en évidence une équivalence entre thiol, dithiol et disulfure.

En ce qui concerne le mécanisme d'action de ces composés, l'interprétation est aussi délicate.

Le mécanisme d'action du mercaptoéthanol a suscité de nombreuses recherches mais demeure encore à l'heure actuelle mal compris.

L'activité du mercaptoéthanol qui est sensiblement différente de celle de son homologue non soufré, l'éthanol, peut donc être attribuée à son groupe - SH. Celui-ci serait capable de participer à la formation de disulfures mixtes (22), mais ce point de vue est maintenant abandonné et les hypothèses nouvelles s'appuient sur les propriétés réductrices du groupe - SH. En effet, des concentrations élevées de mercaptoéthanol réduisent quantitativement les ponts disulfures protéiques (186), ce qui expliquerait la destruction fusoriale. Cependant, il est important de souligner que le pouvoir réducteur du mercaptoéthanol s'exerce alors au moment où les liaisons disulfures auraient dû se former, et non pas sur des liaisons déjà formées.

LIMBOSCH - ROLIN (105) montre que le mercaptoéthanol ne modifie pas le potentiel Redox du milieu, et, de plus, le potentiel du mercaptoéthanol est voisin de celui de la cystéine, métabolite naturel (62).

Mais le fait que l'action stathmocinétisante et l'action mitodépressive soient pratiquement indissociables nous pousse à envisager la perturbation de mécanismes beaucoup plus généraux. Nous devons cependant exclure la respiration car le mercaptoéthanol diminue fort peu la consommation d'oxygène (24, 41) et n'abaisse pas non plus la teneur en ATP cellulaire. La comparaison des effets du mercaptoéthanol sur des levures normales et "petites" suggère à LIMBOSCH-ROLIN (105) "que le point d'attaque du mercaptoéthanol n'est certainement pas la respiration car l'inhibition de croissance est la même que la levure soit capable ou non de respirer."

Sous l'influence d'enzymes appropriées, le mercaptoéthanol peut in vitro participer à la réduction de NAD et, au cours de la réaction, il s'oxyde (98). S'il en est ainsi, les processus d'oxydoréduction qui exigent la présence de NAD, et parmi eux figure l'enchaînement des sous-unités de microtubules, ne peuvent plus s'accomplir. En conséquence, l'inhibition fusoriale et, probablement, la dépression mitotique résulteraient de la réduction et de l'inutilité de NAD, mais on peut également chercher leur origine dans l'inhibition de la synthèse des protéines (168).

Nous noterons néanmoins que, si NAD n'est plus fonctionnel, il est difficilement concevable que la respiration ne soit pas altérée car, dans ces conditions, la glycolyse au moins devrait être bloquée.

En somme, le mécanisme d'action du mercaptoéthanol est encore, à l'heure actuelle, sujet à de nombreuses hypothèses et aucune n'est vraiment satisfaisante.

Quant au dithioérythritol, sa double capacité de maintenir les thiols réduits et de réduire les disulfures devrait théoriquement s'accompagner d'un effet mitoclasique intense. Or, cet effet n'est que partiel mais, par contre, la réduction de l'activité mitotique, importante, est constante. Nous sommes donc amenés, ici encore, à envisager une action très large et notamment le blocage des - SH catalytiques. Avec les données biochimiques existantes, il est difficile de préciser davantage le mécanisme d'action du dithioérythritol.

En ce qui concerne le dithiodiglycol, qui, curieusement, est plus mitoclasique que les autres composés alors qu'il entrave l'action de la colchicine, le mystère demeure entier. On ne peut que constater que le déséquilibre du rapport $\frac{-SH}{-S-S-}$ est responsable d'un effet mitoclasique important lorsqu'il est provoqué par un excès de disulfures.

E - Comparaison des antivitamines

Nous mettrons à part la galactoflavine, inhibiteur de la riboflavine, qui est dénuée d'effet même à des concentrations élevées.

En règle générale, des antivitamines PP c'est l'aminonicotinamide qui est la plus active et l'acétylpyridine la plus toxique.

La dépression mitotique, intense pour les 2 produits, peut aboutir à une mitostase qui s'étale sur plusieurs jours en traitement continu. Pour l'aminonicotinamide, lorsque les concentrations ne sont pas très fortes, on enregistre après 3 heures d'action une disparition quasi complète des métaphases et des anaphases qui réapparaissent après 24 heures. On sait que la plante entière synthétise, dans les feuilles, l'amide nicotinique, qui migre et agit au niveau de la racine comme régulateur de croissance. En conséquence, le déficit initial en amide nicotinique consécutif à l'administration de l'aminonicotinamide provoque la stimulation de la synthèse de la vitamine naturelle qui masque ultérieurement les effets des antivitamines.

La disparition des cinèses provient d'une inhibition préprophasique et prophasique car on note toujours une accumulation de prophases dont certaines sont en "régression".

Les antivitamines ne déterminent qu'une inhibition fusoriale partielle toujours associée à une mitodépression importante. La zone des concentrations actives est très étroite. Cependant, on note une attaque préférentielle du fuseau de cytodiérèse, dès les plus faibles concentrations, d'où résultent de nombreuses cellules binucléées, plurinucléées et polyploïdes, surtout fréquentes avec l'aminonicotinamide.

De nombreux auteurs signalent et admettent que les antivitamines sont incorporées dans une molécule de NAD modifié et s'attaquent, en conséquence, à des réactions dépendantes du transport d'hydrogène (149). Elles enrayent, de ce fait, le déroulement des phosphorylations oxydatives productrices d'A T P (65) et celui de la glycolyse (200). L'aminonicotinamide, par ailleurs, diminue l'absorption d'oxygène et déprime la respiration (84).

Il est donc clair que l'activité mitoclasique des antivitamines ne peut être séparée de l'activité générale sur le métabolisme.

Enfin, le 6 aminonicotinamide étant plus énergique que l'acétylpyridine, on est tenté de conclure que le transport d'hydrogène n'est pas inhibé aussi intensément par le second que par le premier produit. D'ailleurs, JOHNSON (83) rapporte la différence de réactivité entre acétylpyridine et aminonicotinamide sur l'animal entier. En d'autres termes, la capacité de transporter l'hydrogène varie selon que l'aminonicotinamide ou l'acétylpyridine entre dans la constitution de NAD.

2 - RAPPORTS DE LA COLCHICINE AVEC LA REACTION D'OXYDOREDUCTION THIOL - DISULFURE

A - Antagonisme et Synergie

La modification de l'activité mitoclasique de la colchicine, annulation ou renforcement, est bien souvent d'un grand intérêt pour la compréhension du mécanisme d'action de l'alcaloïde.

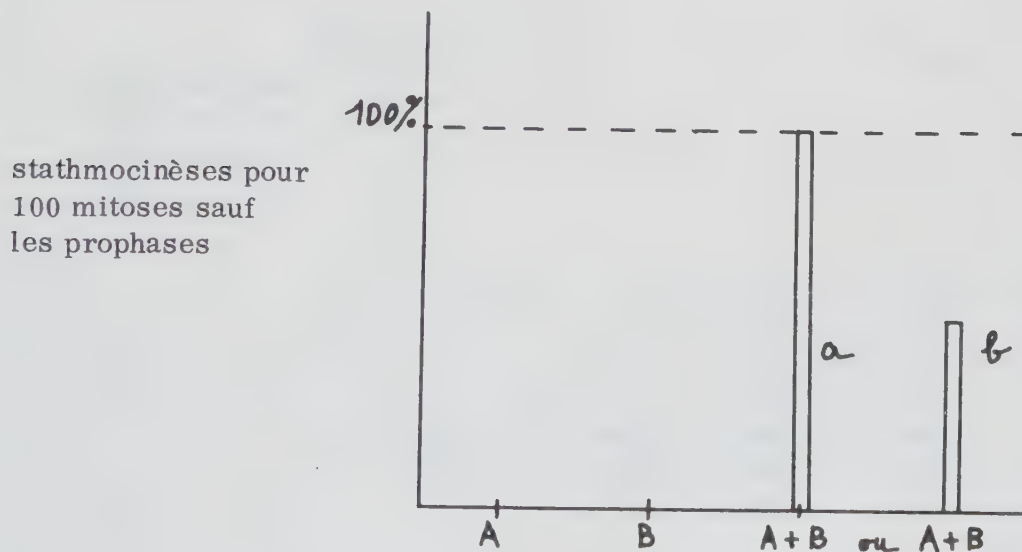
En cas d'antagonisme, les raisons de celui-ci sont nombreuses : inhibition mutuelle de pénétration ou inhibition sélective de la pénétration de l'alcaloïde par l'antagoniste ; ralentissement exagéré de la mitose par l'antagoniste de sorte que les manifestations de l'alcaloïde n'ont pas le temps de s'exprimer avant son élimination etc ... Cependant, notre protocole opératoire évite ces inconvénients dans la mesure du possible. Dans ces conditions, l'existence d'un antagonisme entre la colchicine et un produit donné signifie que l'alcaloïde agit sur un processus dans lequel est directement ou indirectement impliqué l'antagoniste. Selon la nature de ce dernier et selon son rôle biochimique, il est possible d'en déduire ou tout au moins de soupçonner le mécanisme d'action de l'agent mitoclasique.

Au cas où l'action mitoclasique de la colchicine est renforcée par une substance, il y a synergie, mais il est alors nécessaire de faire la part entre synergie additive et synergie potentialisatrice, car "le terme de synergie désigne un phénomène général s'opposant à antagonisme et signifie que les 2 drogues utilisées séparément ou simultanément possèdent qualitativement la même action pharmacologique" (181). Il y a synergie additive lorsque l'effet global obtenu par l'association de 2 produits est égale à la somme des effets partiels et il y a synergie potentialisatrice lorsque l'effet global est supérieur à la somme.

La synergie potentialisatrice peut exister dans un sens et non pas dans l'autre. Ainsi A peut renforcer l'action de B, mais B est inactif vis-à-vis de l'action de A. Nous n'avons pas eu à nous préoccuper de ce problème puisque nous ne voulions modifier que l'action de la colchicine.

"Si les définitions de ce phénomène sont claires, les critères expérimentaux le sont beaucoup moins" (181). Plusieurs méthodes ont été proposées mais aucune n'a donné entière satisfaction.

En cytologie, nous nous basons à la fois sur l'apparition et sur l'intensité d'un phénomène. Ainsi, le cas le plus favorable pour la mise en évidence d'une potentialisation consiste dans une action mitoclasique totale produite par l'association de 2 composés utilisés à leur concentration maximale inactive. La représentation de ce phénomène est la suivante : (Fig. 1a).



Cet exemple de synergie potentialisatrice est, malgré tout, assez rare et, bien souvent, l'interprétation est plus délicate notamment dans le cas où les deux produits, utilisés aux concentrations inactives, ne sont, ensemble, que partiellement mitoclasiques (Fig. 1 b).

L'expérience est alors recommencée avec des concentrations plus élevées d'un seul ou des deux produits, choisies de telle façon que les effets mitoclasiques individuels soient néanmoins faibles.

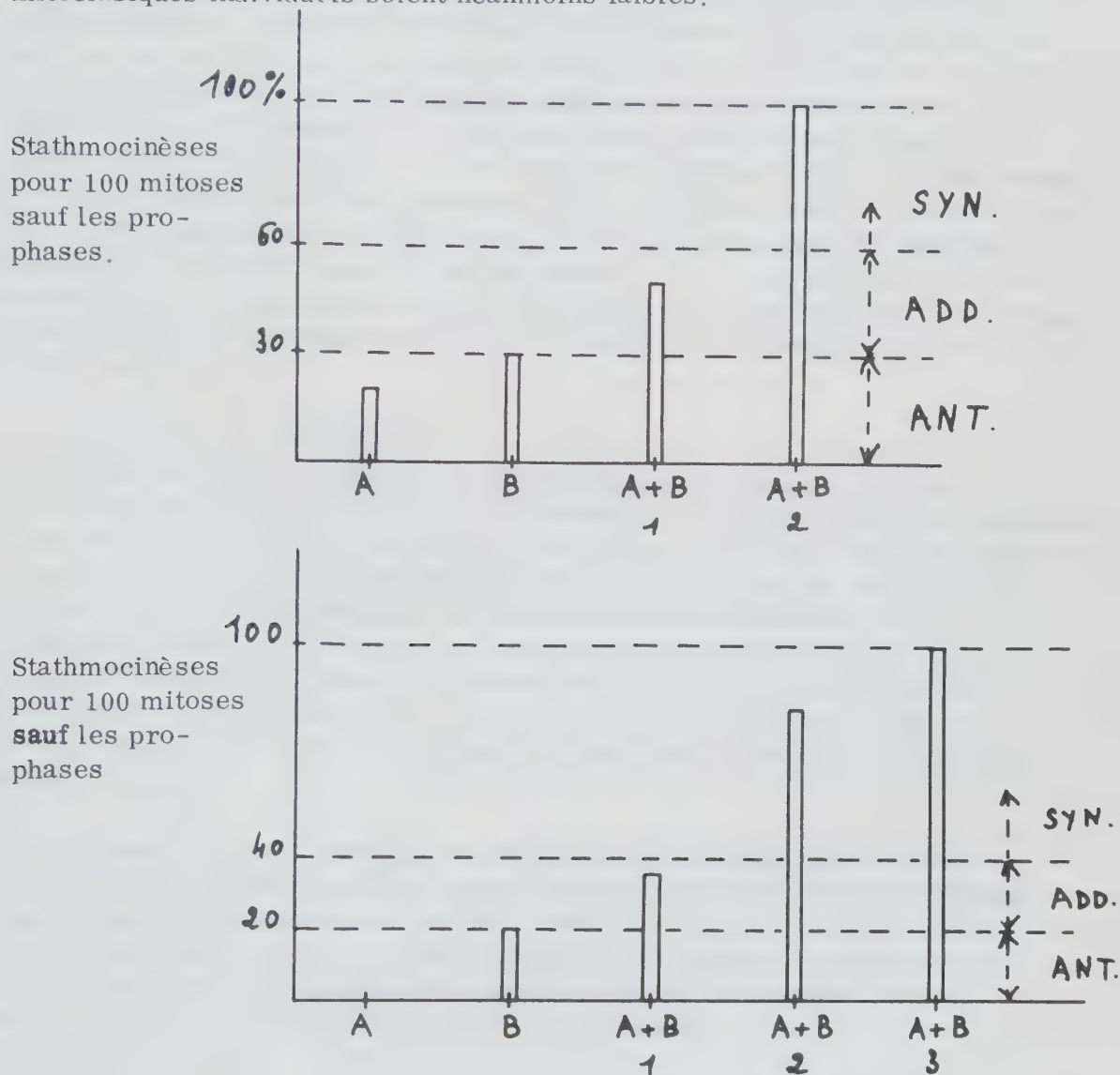


Fig. 3

Sur la figure 2, il y a théoriquement synergie additive (ADD) lorsque le pourcentage de stathmocinèses produites par l'association est égal à la somme des pourcentages de stathmocinèses produites par chacun des 2 composés et il y a potentialisation (SYN) lorsque le pourcentage est plus élevé.

Sur la figure 3, l'activité d'un des 2 produits est nulle. Il n'est donc pas possible de définir une addition et tout effet supérieur à celui du produit le plus mitoclasique pourrait être considéré comme le résultat d'une potentialisation. Il ne faut pas oublier, cependant, que l'inactivité apparente d'un des 2 produits ne veut pas dire que celui-ci soit vraiment inoffensif et qu'il n'altère pas un processus physiologique quelconque mais elle signifie simplement qu'il n'agit qu'insuffisamment pour que son effet soit observable. En conséquence, l'association d'un composé responsable d'une altération partielle, et sans manifestation visible, d'un processus et d'un produit responsable d'une altération totale, et visible, soit du même processus soit d'un autre, peut se traduire par une synergie additive ou par une synergie potentialisatrice. C'est pourquoi, dans les figures 2 et 3, nous pensons à synergie potentialisatrice à partir du moment où l'effet global est au moins 2 fois plus intense que l'effet produit par le composé le plus mitoclasique et à synergie additive pour un effet global inférieur.

Certes, notre interprétation n'échappe pas à de nombreuses critiques mais elle offre au moins l'avantage d'une certaine sécurité dans la conclusion. En outre, la colchicine possède une activité mitoclasique vive, mais aussi très maniable, tandis que les autres produits sont toujours, aux concentrations où nous les employons, dépourvus d'action visible. Par conséquent, dans nos expériences, nous avons fait en sorte que l'activité mitoclasique de l'alcaloïde soit très faible et, ainsi, nous avons réduit le pourcentage d'erreur que comporte notre interprétation. Enfin, l'expression d'une potentialisation est souvent explosive alors que celle d'une addition ne l'est jamais. Dans ces conditions, mise à part une zone liminaire, réduite, où règne l'incertitude entre addition et potentialisation, nos critères nous paraissent suffisants.

L'existence d'une synergie potentialisatrice implique qu'en dehors de tout phénomène secondaire les mécanismes d'action des 2 produits sont différents alors qu'ils sont identiques dans le cas d'une addition. On peut, en effet, penser qu'une addition provient de l'altération de plusieurs voies parallèles aboutissant au même phénomène tandis qu'une potentialisation résulte d'un blocage d'étapes successives, c'est-à-dire dépendantes les unes des autres.

B - Influence des inhibiteurs des groupements thiols sur l'activité mitoclasique de la colchicine

En 24 heures, l'association colchicine - hydroxyde de phénylmercure (Fig. 4) est beaucoup plus mitoclasique que le témoin colchicine. Les jours suivants, l'inhibition fusoriale régresse chez les racines soumises au traitement combiné et devient sensiblement équivalente en intensité à celle du témoin. C'est

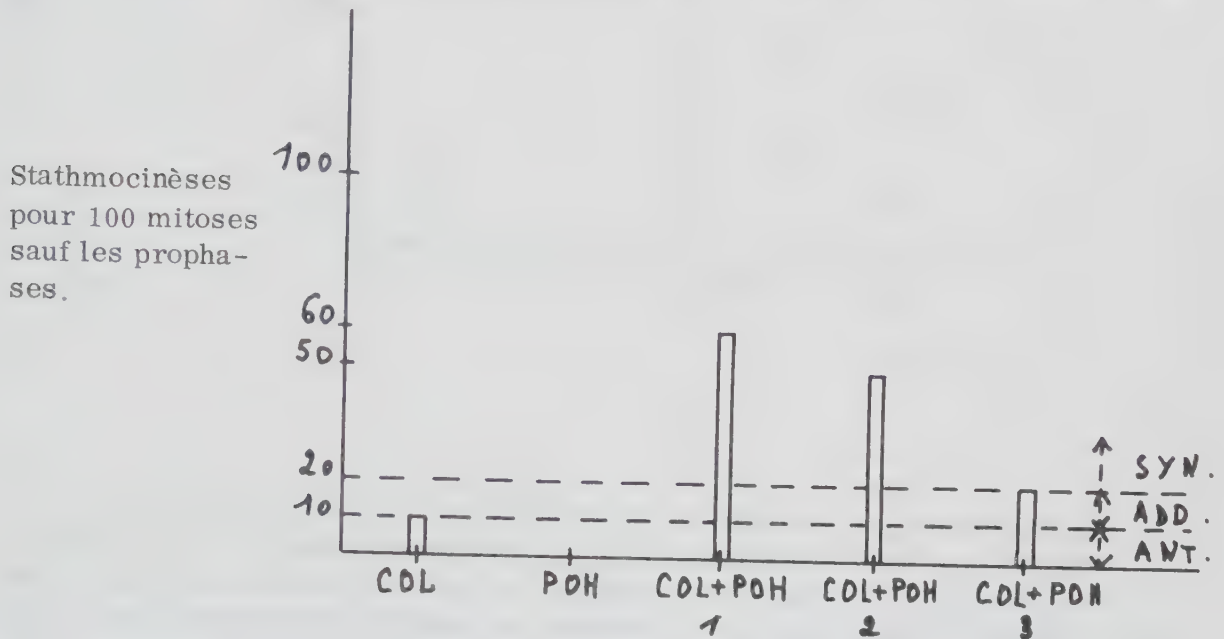


Fig. 4

pourquoi, en dépit de la brève élévation du premier jour, il est peu probable que l'association révèle une synergie potentialisatrice d'autant plus que, même en 24 heures, l'activité mitoclasique est très variable d'un méristème à l'autre (Fig. 4). Il y a donc renforcement de l'action mitoclasique de la colchicine lorsque celle-ci exerce déjà un effet appréciable.

Le N - éthylmaléimide (Fig. 5) ne potentialise pas non plus les effets de la colchicine car il n'a jamais d'effet défavorable sur les mitoses dans les conditions réalisées ici et ce n'est qu'au moment où la colchicine affecte un tiers des mitoses que le mélange devient plus mitoclasique.

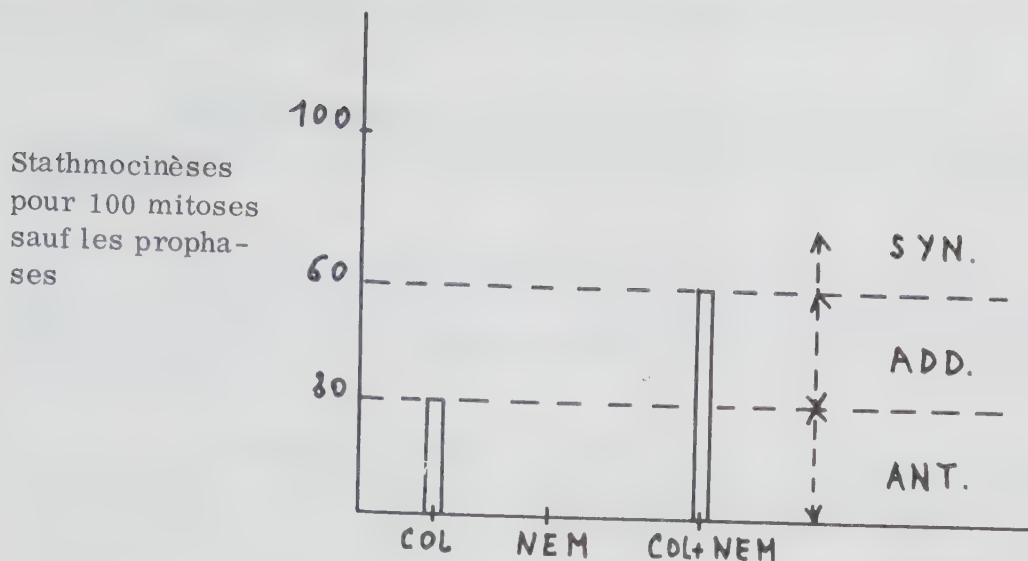


Fig. 5

En somme, le traitement simultané des racines par les inhibiteurs des thiols et par l'alcaloïde se traduit par une synergie additive, qui implique que les modalités d'action de tous ces produits sur la chaîne d'oxydoréduction thiol - disulfure sont très proches les uns des autres. Mais jusqu'ici, rien n'indique que la colchicine possède une affinité particulière pour les groupements thiols. Bien plus, au lieu d'un véritable blocage des thiols, SEGALA et de PIETRANTONY (169) rapportent que leur oxydation est facilitée par la désacétylméthyl-colchicine en présence d'un extrait de levure et que le carbonyl tropolonique se réduit en - CHOH.

En somme, la colchicine, fixée sur des sous-unités de microtubules, empêche leur polymérisation par un mécanisme certainement étranger au blocage des thiols. MAZIA (129) pense à la modification, par l'alcaloïde, de la conformation des sous-unités microtubulaires de sorte qu'elles ne peuvent plus se présenter dans un état favorable à leur enchainement.

Quoiqu'il en soit, nous ne pouvons envisager une action directe de la colchicine sur les - SH. Nous sommes juste en mesure de dire que le blocage des - SH complète le mécanisme hypothétique de la colchicine, argument supplémentaire en faveur du "paradoxe" des thiols (129).

C - Influence des dérivés sulfures sur l'activité mitoclasique de la colchicine

Expérimentalement, le mercaptoéthanol et le dithiodiglycol peuvent stabiliser le fuseau contrairement au dithioérythritol et au chlorhydrate de cystamine.

Les effets biochimiques du dithioérythritol, maintien des -SH à l'état réduit et réduction des ponts -S-S-, ne sont pas favorables à la formation du fuseau et expliquent que le dithioérythritol ne s'oppose pas à l'action mitoclasique de la colchicine.

La complète inactivité du chlorhydrate de cystamine peut être due au fait que ce produit est métabolisable car sa structure est très proche de celle du métabolite naturel, la cystine. On est cependant obligé d'admettre que la cellule n'utilise pas cet excès de liaisons disulfures pour protéger le fuseau contre la colchicine.

La protection exercée par le mercaptoéthanol et le dithiodiglycol semble alors incompréhensible et est peut-être la conséquence d'un effet secondaire sur la mitose. Ces produits sont mitodépresseurs, surtout le mercaptoéthanol, et l'antagonisme constaté vis-à-vis de la colchicine pourrait provenir du blocage partiel de la mitose. Ainsi, la colchicine dont l'effet mitoclasique est fugace serait éliminée avant que son effet puisse s'exprimer, ce qui est en accord avec le retard à l'action mitoclasique et le retour à la normale plus rapide des cinèses déterminés par ces produits. Mais la mitodépression induite par le dithiodiglycol est très faible et, avec des concentrations basses en mercaptoéthanol, la dépression mitotique disparaît alors que la protection du fuseau est encore perceptible.

En somme, plus que d'une stabilisation de l'appareil fusorial, il s'agit d'un effet bénéfique qui porte sur l'enchainement des microtubules et qui résulte vraisemblablement des propriétés particulières, encore ignorées, du mercaptoéthanol et du dithiodiglycol.

DEYSSON (51c) pense que la colchicine bloque le fonctionnement d'une chaîne enzymatique de transporteurs d'hydrogène dans laquelle seraient impliqués des coenzymes pyridiniques et notamment NAD. Par ailleurs, le mercaptoéthanol peut réduire spécifiquement NAD (98). Il est alors difficilement imaginable que la réduction de NAD par le composé sulfhydrylé, qui équivaut à un blocage, puisque, réduit, NAD n'est plus fonctionnel, s'oppose à l'effet mitoclasique de la colchicine.

Ce qui est obscur pour le composé réduit l'est aussi pour le composé oxydé, car on voit mal comment un excès de liaisons disulfures apporté par le dithiodiglycol s'opposerait au blocage du transport de l'hydrogène, à moins d'invoquer un processus de régulation de la réaction d'oxydoréduction qui est possible mais pas encore prouvé. L'existence de cet antagonisme se heurte également

à l'hypothèse de SEGALA et de PIETRANTONY (169). Il y a, en effet, une contradiction flagrante entre le fait que la colchicine soit mitoclasique et le fait qu'elle ait la possibilité d'oxyder les - SH en - S - S -, réaction qui, au contraire, est favorable à l'enchaînement des microtubules. On comprend mal, dans ces conditions, l'inhibition de l'effet de la colchicine par un excès de disulfure.

Nous n'avons donc aucune raison précise pour justifier d'une relation directe entre la colchicine et les composés soufrés. Une nouvelle fois, on est amené à envisager un effet indirect de la colchicine sur la réaction d'oxydoréduction. En d'autres termes, si l'alcalofde, fixé sur les microtubules, agit indirectement sur cette réaction, cela signifie que, même s'il est capable d'accepter les hydrogènes sur le groupement C = O comme le soulignent SEGALA et de PIETRANTONY, il n'est pas du tout certain qu'il favorise l'oxydation des groupements sulfhydrylés.

D - Influence des antivitamines sur l'activité mitoclasique de la colchicine

L'addition à la colchicine de galactoflavine et d'aminonicotinamide, à faibles doses, n'entraîne pas d'inhibition fusoriale, alors que les vitamines contrarient l'action stathmocinétisante de la colchicine.

L'association colchicine - 6-aminonicotinamide (Fig. 6 et 7) témoigne d'une véritable synergie potentialisatrice qui indique que les mécanismes d'action des 2 substances sont différents. Le 6-aminonicotinamide participe à l'élaboration

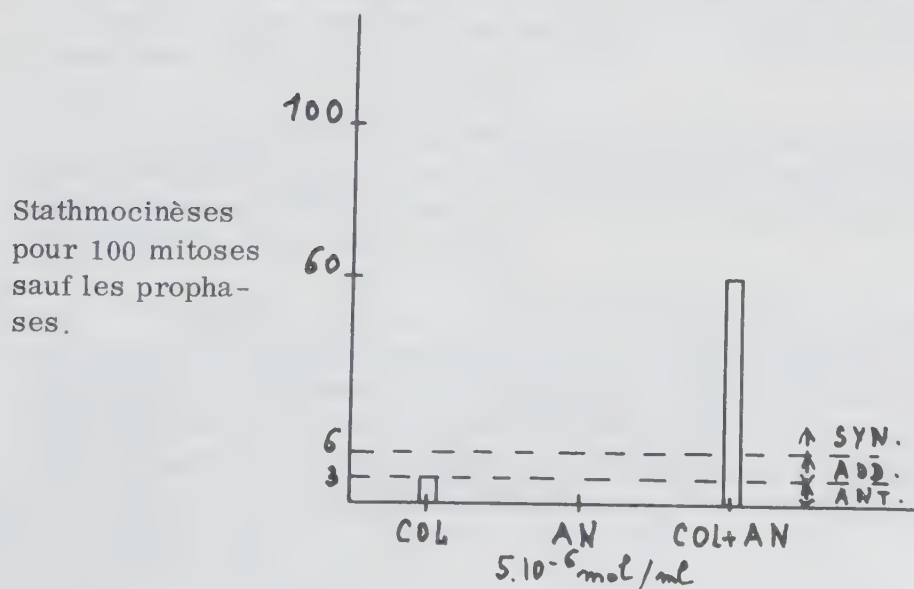


Fig. 6

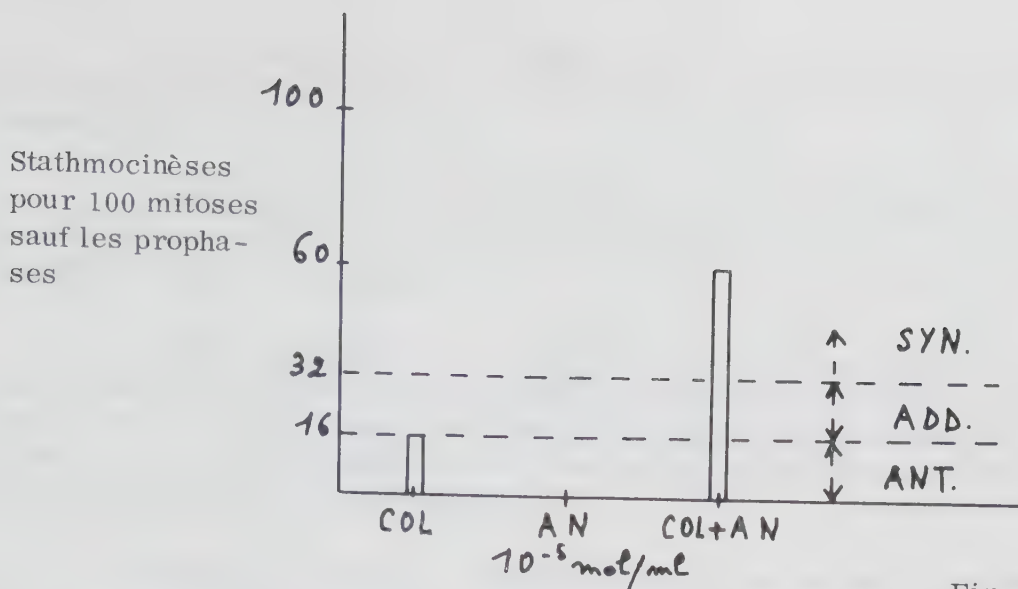


Fig. 7

du 6-amino NAD ou NADP, coenzymes rendus inactifs par perte d'amide nicotinique. La fixation de la colchicine sur les sous-unités de microtubules jointe à l'inhibition modérée du transport d'hydrogène peut expliquer la synergie observée. La conclusion qui s'impose est que la colchicine n'aurait pas d'activité antidéshydrogénasique directe et que l'attache de l'alcaloïde sur les microtubules est sûrement d'une importance capitale.

Nos résultats s'accordent bien avec ceux de TAYLOR et de ses collaborateurs, mais on ne peut nier que le rôle des déshydrogénases dans la mise en place du fuseau ne soit primordial comme le prouvent l'activité mitoclasique de l'aminonicotinamide et surtout la protection du fuseau exercée par le nicotinamide et la riboflavine vis-à-vis de la colchicine.

Par ailleurs, une inhibition de l'activité de la succino-déshydrogénase, de la lacticodéshydrogénase et de la glucose-6 phosphate-déshydrogénase, dont les coenzymes sont NAD et NADP, a été mise en évidence dans le foie de souris sous l'influence de la colchicine (139).

Enfin, SEGALA et di PIETRANTONY (169) montrent que l'oxydation *in vitro* des - SH par la colchicine est facilitée par addition d'un extrait de levure doué d'activité enzymatique. DEYSSON a identifié la partie active de l'extrait aux précurseurs de NAD et NADP. Le transfert de l'hydrogène des - SH sur le carbonyle tropolonique nécessite donc l'intervention de transporteurs d'hydrogène mais cela ne confirme pas le rôle favorable de la colchicine dans l'oxydation des thiols.

Ainsi, de nombreux faits expérimentaux suggèrent que la colchicine a un rapport au moins indirect avec les déshydrogénases et la réaction d'oxydo-réduction thiol-disulfure.

Nous rappellerons que DEYSSON a déduit son hypothèse concernant le mécanisme de la colchicine de l'antagonisme colchicine-amide nicotinique effectué à l'aide du test Allium.

Il est alors important de souligner que le protocole opératoire de ce type d'expérience impose l'administration, en traitement préalable, de l'amide nicotinique et l'emploi d'une concentration de colchicine responsable d'une action forte, mais fugace, compatible avec l'observation des effets de l'alcaloïde sur 1 ou 2 cycles mitotiques au maximum.

Dans ces conditions, le traitement préliminaire par le nicotinamide et la courte durée de l'expérience laissent supposer que la préparation du fuseau dans les cellules qui sont sur le point de se diviser s'est faite en présence d'une saturation cellulaire en transporteurs d'hydrogène dont l'amide nicotinique est un précurseur.

Or, les travaux de THEORELL et BONNICHSEN (184), repris par de nombreux auteurs, en particulier par CUTOLO (39), par VAN EYS, KAPLAN et STOLZENBACH (188), mettent en évidence une interaction entre les thiols et les coenzymes pyridiniques, essentiellement NAD, sous l'influence d'une enzyme spécifique. On peut donc supposer que les coenzymes, en réagissant immédiatement avec les thiols, gênent l'action de la colchicine administrée ultérieurement, ce qui justifie l'antagonisme observé.

A l'inverse, ceci voudrait dire que, dans une cellule traitée par la colchicine seule et qui ne dispose que de la teneur en transporteurs d'hydrogène physiologiquement nécessaire à son métabolisme au lieu d'en être saturée, l'alcaloïde qui va se fixer sur les sous-unités microtubulaires, serait responsable de l'inactivation, peut-être due à la grosseur de sa molécule, du lieu où doivent agir les transporteurs d'hydrogène rendus, de cette façon, non fonctionnels.

Ainsi, la colchicine inhiberait indirectement le fonctionnement de la chaîne des transporteurs d'hydrogène.

Cependant, l'expérience associant colchicine et acétylpyridine paraît se porter à l'encontre de cette interprétation. En effet, ni une potentialisation ni une addition n'est mise en évidence. Comme l'acétylpyridine participe également à la biogénèse de coenzymes pyridiniques, il paraît étonnant que les associations aminonicotinamide - colchicine et acétylpyridine - colchicine aboutissent à des résultats opposés.

Mais JOHNSON (83) signale que les antagonistes de la vitamine PP ne sont pas tous d'une égale efficacité sur l'animal entier.

Personnellement, nous avons étudié sur les cellules végétales les effets de l'aminonicotinamide, de l'acétylpyridine et de l'acide 3 pyridine-sulfonique. Ce dernier ne provoque aucun trouble de la mitose ni de la croissance pour laquelle il se montre même stimulant. Nos conclusions rejoignent donc celles de JOHNSON.

VAN EYS, KAPLAN et STOLZENBACH (188) soulignent que la réactivité des NAD et NADP modifiés par l'acétylpyridine et l'acide 3-pyridine-sulfonique avec les thiols n'est pas inhibée par l'antagoniste, au contraire, elle est même parfois plus intense que pour les coenzymes naturelles.

Ainsi, les propriétés mitoclasiques de la colchicine ne sont pas renforcées par l'acétylpyridine qui n'altère pas le rôle des transporteurs d'hydrogène, d'autant plus que les concentrations employées dans une expérience de ce type sont toujours faibles.

De l'ensemble de notre expérimentation, il ressort que la colchicine, fixée sur les subunités de microtubules, empêche indirectement le fonctionnement enzymatique du transport d'hydrogène et exerce ainsi une activité antidéshydrogénasique qui perturbe la réaction d'oxydoréduction thiol-disulfure. Nos conclusions vérifient l'hypothèse de DEYSSON mais laissent encore dans l'ombre bien des problèmes : comment relier l'activité antidéshydrogénasique de la colchicine au rôle des carbones 14 et 15, dont l'importance, soulignée par DEYSSON (45), a été retrouvée par SCHINDLER (167) et par SEGALA et di PIETRANTONY (169) ? Comment interpréter la protection du fuseau par le mercaptoéthanol et le dithio-diglycol alors que le dithioérythritol et le chlorhydrate de cystamine sont inactifs ? Si l'activité antidéshydrogénasique est véritablement responsable de l'action mitoclasique de la colchicine, quelle est la place, dans l'élaboration du fuseau, de la réaction d'échange thiol-disulfure, réaction en chaîne amorcée par les - SH ?

Autant de questions qui demeurent actuellement sans réponse et qui nous incitent à poursuivre nos recherches dans l'espoir d'élucider plus complètement le mécanisme d'action de la colchicine, persuadé que le jour où il nous sera connu, nous aurons fait un grand pas, en raison de la spécificité de l'action de l'alcaloïde, vers la compréhension de la mise en place et du fonctionnement de l'appareil fusorial.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La formation du fuseau dépend de l'oxydation des groupements - SH en - S - S -, ce qui permet l'enchaînement des sous-unités de microtubules. La création de ponts disulfures, dans la cellule, semble résulter de 2 processus :

- d'une réaction catalytique d'échange thiol-disulfure qui n'exige qu'une petite quantité de - SH pour transformer des liaisons - S - S - intramoléculaires en liaisons - S - S - intermoléculaires.

- d'une réaction d'oxydo-réduction, réversible, dans laquelle interviennent des transporteurs d'hydrogène :



Or, les travaux des différents auteurs (51c, 139) indiquent que la colchicine, qui est l'agent mitoclasique par excellence, possède une activité anti-déshydrogénasique. Ainsi, un excès de précurseurs de NAD ou NADP protège le fuseau contre l'action de la colchicine.

Etant donné que l'intervention des - SH dans l'élaboration de l'appareil fusorial est primordiale et que la colchicine inhibe le fonctionnement de déshydrogénases, nous avons voulu étudier les anomalies du fuseau provoquées par la rupture de l'équilibre thiol-disulfure, suggéré par la réaction d'oxydoréduction réversible.

Nous avons utilisé des inhibiteurs des groupements thiols, le N-éthylmaléimide et l'hydroxyde de phénylmercure, des substances pourvues d'une ou 2 fonctions - SH, le mercaptoéthanol et le dithioérythritol, des composés à liaison - S - S -, le dithiodiglycol et le chlorhydrate de cystamine, des antivitamines antagonistes des précurseurs de transporteurs d'hydrogène, le 6-aminonicotinamide, l'acétylpyridine, le galactoflavine.

Ensuite, nous avons essayé d'annuler ou de renforcer l'effet mitoclasique de la colchicine par ces différents composés pour étudier les relations de l'alcaloïde avec la réaction d'oxydoréduction.

Après une première partie consacrée à la mise au point des connaissances sur l'appareil fusorial, nous avons décrit les résultats de nos expériences avec :

Le N-éthylmaléimide

En raison d'une toxicité élevée, ce composé est très peu maniable. En traitement continu les stathmocinèses n'apparaissent jamais. L'inhibition fusoriale

ne survient qu'en retour après une exposition brève, 10', à l'inhibiteur utilisé à $5 \cdot 10^{-7}$ mol/ml. Dans ces conditions expérimentales, les racines meurent le 3ème jour.

L'Hydroxyde de phénylmercure

Ce composé provoque la tuméfaction des racines et inhibe la croissance à partir de $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml. Il agit à de très basses concentrations. Chromatoclasique dès $2,5 \cdot 10^{-10}$ mol/ml, il exerce une activité mitoclasique et une activité mitodépressive à partir de $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/ml. Au voisinage de cette concentration seuil, l'intensité de l'inhibition fusoriale varie avec les méristèmes. Pour des concentrations supérieures, la mort survient rapidement alors que toutes les mitoses sont en stathmocinèses. En général, l'effet mitoclasique est lié à la toxicité, sauf en retour.

Le β mercaptoéthanol

D'abord légèrement stimulant de la croissance, il devient inhibiteur à partir de $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, concentration pour laquelle l'effet mitodépresseur et la toxicité se manifestent également. Les premiers symptômes d'inhibition fusoriale apparaissent à $4 \cdot 10^{-5}$ mol/ml en 3 heures mais n'intéressent en général que les métaphases. Si on augmente les temps de traitement et les concentrations, il n'est pas possible de développer l'action mitoclasique car la mitodépression et la toxicité sont alors trop importantes.

Le Dithioérythritol

Ce composé ralentit la croissance pour des concentrations supérieures ou égales à $5 \cdot 10^{-8}$ mol/ml. A $5 \cdot 10^{-7}$ mol/ml, il détermine un blocage des prophases et l'activité mitotique diminue peu à peu. L'action mitoclasique qui s'exprime à partir de $5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml ne s'exerce jamais sur toutes les mitoses en même temps. Le dithioérythritol est beaucoup plus actif que le mercaptoéthanol.

Le Dithiodiglycol

La toxicité du disulfure se manifeste à $2 \cdot 10^{-6}$ mol/ml et s'accompagne d'une dépression mitotique consécutive à un blocage prophasique. Les anomalies fusoriales, discrètes à $4 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, deviennent de plus en plus nombreuses. Pour les concentrations supérieures à 10^{-5} mol/ml, toutes les métaphases sont dépourvues de fuseau. Le dithiodiglycol, plus mitoclasique que les composés sulfhydrylés, n'exerce son activité qu'à des concentrations létales. L'effet chromatoclasique n'est jamais important.

Le 6-aminonicotinamide

L'effet essentiel de ce composé réside dans l'inhibition du phragmoplaste, signe précoce de l'altération fusoriale. Il en résulte de nombreuses cellules binucléées. La dépression mitotique est toujours importante surtout au-dessous de 10^{-5} mol/ml et est due à un blocage prophasique. Le fuseau n'est détruit que dans une zone étroite de concentrations, entre 2,5 et 4. 10^{-5} mol/ml, qui sont en même temps mortelles.

L'Acétylpyridine

L'action de ce composé est très proche de celle de l'aminonicotinamide mais il est plus toxique et moins mitoclasique. A $7,5 \cdot 10^{-6}$ mol/ml, il est mitodé-presseur. L'effet mitoclasique se traduit essentiellement par une inhibition du phragmoplaste ; les stathmocinèses ne sont nombreuses que pour $5 \cdot 10^{-5}$ mol/ml en 3 heures.

La Galactoflavine

Cet antagoniste de la riboflavine est dénué d'effet aux concentrations que nous avons employées.

Ensuite, tous ces produits ont été associés ou opposés à la colchicine. L'association de la colchicine avec le N - éthylmaléimide se traduit par une synergie additive ainsi que l'association avec l'hydroxyde de phénylmercure. Dans les 2 cas, l'action mitoclasique de l'association est légèrement supérieure à celle des témoins respectifs à condition que la colchicine soit mitoclasique.

En revanche, l'effet de l'alcaloïde est potentialisé par l'aminonicotinamide mais pas par l'acétylpyridine. Ce phénomène est attribué au fait que les transporteurs d'hydrogène modifiés par l'acétylpyridine conservent une activité alors qu'ils la perdent complètement s'ils sont modifiés par l'aminonicotinamide.

Deux substances s'opposent à la colchicine, le mercaptoéthanol et le dithiodiglycol. L'action mitoclasique est retardée et les mitoses altérées retournent plus vite à la normale.

Le Dithioérythritol, la chlorhydrate de cystamine ne modifient pas l'activité de l'alcaloïde.

De ces résultats, nous concluons que la colchicine n'a pas d'action directe sur la réaction d'oxydoréduction thiol-disulfure et que son effet sur le fuseau est la conséquence d'une inhibition indirecte de déshydrogénases, conclusion qui est tout à fait en accord avec l'idée de DEYSSON. Nous pensons que la colchicine, fixée sur les sous-unités de microtubules, inactive un lieu privilégié où doivent agir les transporteurs d'hydrogène et empêche en conséquence la réaction d'oxydation qui est à l'origine de l'édification de l'appareil fusorial.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ADELMAN (M. R.), BORISY (G. G.), SHELANSKI (M. L.), WEISENBERG (R.)
et TAYLOR (E. W.).

Cytoplasmic filaments and tubules - Federation Proc., 1968, 27 1186 - 1193
- 2 - ALOV (I. A.) et SPIZ (M. E.)

The significance of sulfhydryl groups of protein in the process of mitotic cell
division - Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1966, 166, 965 - 967.
- 3 - AMBROSE (E.) et BAJER (A.)

The analysis of mitosis in single living cells by interference microscopy -
Proc. Roy. Soc. (London) B, 1960, 153, 375 - 366.
- 4 - ANDRE (J.) et BERNHARD (W.)

The centriole and the centriolar region. Excerpta Medica, Internat Congress
Ser, 1964, n° 77, p. 9.
- 5 - ANGULO - CARPIO (D.), SILIO (F.) et FIGUERAS (C.)

Accion de substancias bloqueantes de sulfihidrilos sobre la division celular -
Genet, Iberica, 1965, 17, 269 - 302.
- 6 - ASAHI (T.), BANDURSKI (R. S.) et WILSON (L. G.)

Yeast sulfate-reducing system. II - Enzymatic reduction of protein disulfide -
J. Biol. Chem., 1961, 236, 1830 - 1835
- 7 - BAJER (A.)

Living smears from endosperm - Experientia, 1955, 11, 221 - 222.
- 8 - BAJER (A.)

Behavior of chromosomal spindle fibers in living cells -
Chromosoma, 1965, 16, 381 - 390
- 9 - a - BAJER (A.)

Fine structure studies on phragmoplast and cell plate formation -
Chromosoma, 1968, 24, 383 - 417

- b - BAJER (A.)
 Behavior and fine structure of spindle fibers during mitosis in endosperm -
 Chromosoma, 1968, 25, 249 - 281
- 10 - BAJER (A.) et MOLE - BAJER (J.)
 Endosperm - material for the study on the physiology of cell division -
 Acta Soc. Bot. Poloniae, 1954, 23, 69 - 110
- 11 - BAL (A.K.) et GROSS (P.R.)
 Suppression of mitosis and macromolecular synthesis in onion roots by
 heavy water - J. Cell Biol., 1964, 23, 188 - 193
- 12 - BARRON (E.S.G.)
 Thiol groups of biological importance. Advan.in enzymol., 1951, 11, 201 - 266
- 13 - BEHNKE (O.)
 The effect of colchicine and sodium cacodylate on the spindle of dividing
 vertebrate cells - J. Ultrastruct. Res., 1965, 12, 241 - 242
- 14 - BEHNKE (O.) et FORER (A.)
 Evidence for four classes of microtubules in individual cells - J. Cell Sci.,
 1967, 2, 169 - 192
- 15 - BENSCH (K.G.) et MALAWISTA (S.E.)
 Microtubule crustals : a new biophysical phenomenon induced by Vinca
 alkaloids - Nature, 1968, 218, 1176 - 1177
- 16 - BENSCH (K.G.) et MALAWISTA (S.E.)
 Microtubular crystals in mammalian cells - J. Cell Biol., 1969, 40
 95 - 107.
- 17 - BENSCH (K.G.), MARANTZ (R.), WISHNIEWSKI (H.) et SHELANSKI (M.L.)
 Introduction in vitro of microtubular crystals by alkaloids - Science,
 1969, 165, 495 - 496

- 18 - BIBRING (T.) et BAXANDALL (J.)
Mitotic apparatus : The selective extraction of protein with mild acid -
Science, 1968, 161, 377 - 379
- 19 - BIBRING (T.) et BAXANDALL (J.)
Immunochemical studies of 22 S protein from isolated mitotic apparatus -
J. Cell Biol., 1969, 41, 577 - 590
- 20 - a - BORISY (G.C.) et TAYLOR (E.W.)
The mechanism of action of colchicine. I - Binding of colchicine ^3H to
cellular protein - J. Cell Biol., 1967, 34, 525 - 533
- b - BORISY (G.C.) et TAYLOR (E.W.)
The mechanism of action of colchicine II. Colchicine binding to sea urchin
eggs and the mitotic apparatus - J. Cell Biol., 1967, 34, 535 - 548
- 21 - BOYER (P.D.)
Sulphydryl and disulfide groups of enzymes, in "The Enzymes" -
Academic Press - New York, Vol I, 1959, 511 - 588
- 22 - BRACHET (J.)
Effect of mercaptoethanol and lipoic acid on morphogenesis -
Nature, 1962, 193, 87 - 88
- 23 - BRACHET (J.)
The role of nucleic acids and sulphydryl groups in morphogenesis (amphibian
egg development, regeneration in acetabularia). Advan. Morphogenesis, 1964,
3, 247 - 300
- 24 - BRACHET (J.), CAPE (M.), DECROLY (M.), QUERTIER (J.) et SIX (N.)
Etude des effets biochimiques du β mercaptoéthanol sur les oeufs de Batraciens.
Developmental Biol., 1961, 3, 424 - 443
- 25 - BRACHET (J.), CAPE (M.), DECROLY (M.) et SIX (N.)
Quelques effets biochimiques du β mercaptoéthanol sur le foie de souris et de
rat - Biochim. Biophys. Acta, 1961, 51, 347 - 356

- 26 - BRACHET (J.), DECROLY (M.) et QUERTIER (J.)
Groupes sulfhydriles et morphogénèse. III. Etudes biochimiques des effets du β mercaptoéthanol sur les embryons de Batraciens et de l'algue Acetabularia mediterranea. *Developmental Biol.*, 1963, 6, 113 - 131.
- 27 - BRACHET (J.) et MIRAUX-JONKHEERE (A.)
Les effets du β mercaptoéthanol sur l'incorporation des précurseurs des protéines et des acides nucléiques dans le foie et l'intestin de souris. *Exper. Cell. Res.*, 1962, 27, 539 - 547
- 28 - BRESSLER (R.) et WAKIL (S.J.)
Studies on the mechanism of fatty acid synthesis - XI - The product of the reaction and the role of sulphhydryl groups in the synthesis of fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 1441 - 1448
- 29 - BRIDGES (B.A.)
Sensitization of Escherichia Coli to gamma radiation by N-ethylmaleimide - *Nature*, 1960, 188, 415
- 30 - BRIDGES (B.A.) et MUNSON (R.J.)
Radiosensitization by N-éthylmaléimide. Observations with sensitive and resistant strains of Escherichia Coli. *Internat. J. Rad. Biol.*, 1967, 13, 179 - 181
- 31 - BUCHER (N.L.) et MAZIA (D.)
Deoxyribonucleic acid synthesis in relation to duplication of centers in dividing eggs of the sea urchin Strongylocentrotus purpuratus. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1960, 7, 651 - 655
- 32 - BURGESS (J.) et NORTHCOTE (D.H.)
The relationship between the endoplasmic reticulum and microtubular aggregation and disaggregation - *Planta*, 1968, 80, 1 - 14.
- 33 - CAPLAN (A.I.), ZWILLING (E.) et KAPLAN (N.O.)
3-acetylpyridine : Effects in vitro related to teratogenic activity in chicken embryos - *Science*, 1968, 160, 1009 - 1010
- 34 - CHAKRABORTY (A.) et BISWAS (B.B.)
The effect of colchicine on nucleic acid and protein synthesis. *Exper. Cell Res.*, 1965, 38, 57 - 65

35 - CLELAND (W. W.)

Dithiothreitol, a new protective reagent for - SH groups - Biochem., 1964, 3, 480 - 482

36 - COOK (E. S.), KREKE (C. W.), Mc DEVITT (M. L.) et BARTLETT (M. D.)

The action of phenylmercuric nitrate, I. Effect on enzyme systems.
J. Biol. Chem., 1946, 162, 43 - 49

37 - CREASEY (W. A.) et CHOU (T. C.)

The binding of colchicine by sarcoma 180 Cells. Biochem. Pharmacol.
GB, 1968, 17, 477 - 481

38 - CREASEY (W. A.) et MARKIW (M. E.)

Biochemical effects of the Vinca alkaloids. II - A comparison of the effects
of colchicine and vincristine on the synthesis of ribonucleic acids in Ehrlich
ascites carcinoma cells - Biochim. Biophys. Acta, 1964, 87, 601 - 609

39 - CUTOLO (E.)

Lipoic acid dehydrogenase in yeast. Arch. Biochem. Biophys., 1956, 64,
242 - 243.

40 - DASS (C. M. S.) et SAPRA (G. R.)

Effets of β mercaptoethanol on the binary fission in Stylonychia notophora
(Stokes) - Exper. Cell Res., 1966, 43, 622 - 632

41 - DECROLY (M.), SIX (N.) et CAPE (M.)

Etude des effets biochimiques du mercaptoéthanol - Arch. intern. Physiol.
Biochim., 1961, 69, 380 - 382

42 - DESCOTILS - HEERNU (F.), QUERTIER (J.) et BRACHET (J.)

Quelques effets du β mercaptoéthanol et du dithiodiglycol sur la régénération.
Developmental Biol., 1961, 3, 277 - 296

43 - DEYSSON (G.)

Contribution à l'étude du "syndrome mitoclasique" - Thèse Doct. Pharm.
Etat - PARIS, 1948

44 - DEYSSON (G.)

Recherches sur la perméabilité des cellules végétales. Contribution à l'étude de l'influence exercée par diverses substances agissant sur l'état des lipides. Rev. Cytol. Biol. végétales, 1952, 13, 153 - 315

45 - DEYSSON (G.)

Relations entre constitution chimique et activité mitoclasique dans la série de la colchicine - Coll. Intern. du CNRS, n° 88, Montpellier, 17 - 21 Mai 1959.

46 - DEYSSON (G.)

Les effets des composés chimiques antimitotiques sur la cellule végétale. Leur intérêt pour la physiopathologie des mitoses. Chemotherapia, 1961, 2, 138-162

47 - DEYSSON (G.)

Influence de la griséofulvine sur les propriétés antimitotiques de la colchicine. Ann. Pharm. Fr., 1964, 22, 89 - 95

48 - DEYSSON (G.)

Antimitotic substances - Internat. Rev. Cytol., 1968, 24, 99 - 148

49 - DEYSSON (G.) et BENBADIS (M. C.)

Etude ultrastructurale de la mise en place de l'appareil fusorial dans les cellules méristématiques des végétaux supérieurs. C.R. Soc. Biol., 1968, 162, 601 - 604

50 - DEYSSON (G.) et BENBADIS (M. C.)

Etude ultrastructurale de la réapparition des microtubules interphasiques après la mitose dans les cellules méristématiques des végétaux supérieurs. C.R. Soc. Biol., 1969, 163, 1083 - 1085

51 - a - DEYSSON (G.) et DELAGE (M.)

Protection exercée par un extrait de levure de bière vis-à-vis de l'action mitoclasique de la colchicine. Etude à l'aide du Test Allium. C.R. Ac. Sci., 1965, 261, 4490 - 4492

- b - DEYSSON (G.) et DELAGE (M.)

Etude à l'aide du Test Allium de l'influence de divers constituants de la levure de bière sur l'action mitoclasique de la colchicine. Protection exercée par un mélange de vitamines du groupe B - C.R. Ac. Sc., 1965, 261, 4811 - 4813

- c - DEYSSON (G.) et DELAGE (M.)

Etude à l'aide du Test Allium de l'influence de diverses vitamines du groupe B sur l'action mitoclasique de la colchicine. Protection exercée par un mélange d'amide nicotinique et de riboflavine. C.R. Ac. Sc., 1965, 261, 5187 - 5190

- 52 - DIETRICH (J.)

Application de la microradiographie par contact à l'étude de la division cellulaire - Thèse Sci. Etat, Strasbourg, 1963.

- 53 - DIETRICH (L.S.), FRIEDLAND (I.M.), et KAPLAN (L.A.)

Pyridine nucleotide metabolism : mechanism of action of the niacin antagonist : 6 aminonicotinamide. J. Biol. Chem., 1958, 233, 964 - 968

- 54 - DIETRICH (L.S.), KAPLAN (L.A.), FRIEDLAND (I.M.) et MARTIN (D.S.)

Quantitative biochemical differences between tumor and host tissue. VI. 6 aminonicotinamide antagonism of DPN - dependent enzymatic systems. Cancer Res., 1958, 18, 1272 - 1280

- 55 - DIETRICH (L.S.), MUNIZ (O.), FARINAS (B.) et FRANKLIN (L.)

6 aminonicotinamide ¹⁴C utilization by the 755 tumor and host liver tissue. Cancer Res., 1968, 28, 1652 - 1654

- 56 - DIRKSEN (E.R.)

The isolation and characterization of asters from artificially activated sea urchin eggs. Exper. Cell Res., 1964, 36 - 256-269

- 57 - DUSTIN (P.)

Mitotic poisoning at metaphase and - SH proteins - Exper. Cell Res., 1949, 1, 153 - 155

- 58 - EIGSTI (O.J.) et DUSTIN (P.)

Colchicine in agriculture, medicine, biology and chemistry. Iowa State College Press, U.S.A. 1 vol. 1955

- 59 - ELLIS (R.J.)

Sulfur metabolism : the usefulness of N - ethylmaleimide. Nature, 1966, 211, 1266

- 60 - ERNST (H.) et HAGEN (V.)

Untersuchungen über die Verteilung und Reaktions - Fähigkeit von Sulfhydryl in der tierischen Zelle. Z. Naturforsch., 1959, 14, 104 - 110

- 61 - FAUTREZ - FIRLEFYN (N.) et FAUTREZ (J.)

Développement anormal du plasme périnucléaire dans l'oeuf en segmentation d'Artemia salina sous l'effet du β mercaptoéthanol et du dithiodiglycol. Exper. Cell Res., 1963, 31, 1 - 7

- 62 - FISCHER (E.K.)

Oxidation - reduction potentials of certain sulfhydryl compounds, J. Biol. Chem., 1930, 89, 753 - 763

- 63 - FISKESJO (G.)

Some results from Allium Tests with organic mercury halogenides. Hereditas, 1969, 62, 314 - 322

- 64 - FOTAKIS (N.S.)

Die Wirkung von β mercaptoathanol und α lipoicsäure auf die HeLa Zellkultur Exper. Cell Res., 1963, 30, 600 - 602

- 65 - FRIEDLAND (I.M.), KAPLAN (L.A.), DIETRICH (L.S.) et SHAPIRO (D.M.)

6 aminonicotinamide antagonism of pyridine nucleotide metabolism : effect on the acid soluble nucleotides of tumor tissus. Federation Proc., 1958, 17, 224

- 66 - FRIEDMANN (E.)

Spectrophotometric investigation of the interaction of glutathione with maleimide and N - ethylmaleimide - Biochim. Biophys. Acta, 1952, 9, 65 - 75

- 67 - FRIEDMANN (E.), MARRIAN (D.H.) et SIMON REUSS (I.)

Antimitotic action of maleimide and related substances. Brit. J. Pharmacol., 1949, 4, 105 - 108

- 68 - FRIEDMANN (E.), MARRIAN (D.H.) et SIMON REUSS (I.)

Mitosis of chick fibroblasts in the presence of unsaturated imines and sulfhydryl compounds - Biochim. Biophys. Acta, 1952, 9, 61 - 64

- 69 - GAVIN (R.H.) et FRANKEL (J.)
- The effects of α -methylmercaptoethanol on cellular development in Tetrahymena pyriformis. J. Exptl. Zool., 1966, 161, 63 - 83
- 70 - GRUENDWEDEL (D.W.) et DAVIDSON (N.)
- Complexing and denaturation of DNA by methylmercuric hydroxyde. 1. Spectrophotometric studies. J. Mol. Biol., 1966, 21, 129 - 144
- 71 - GUIDOTTI (G.) et KONIGSBERGER (W.)
- The characterization of modified human hemoglobin - J. Biol. Chem., 1964, 239, 1474 - 1484
- 72 - GUSTAFFSON (M.K.S.)
- Effect of colchicine on DNA synthesis in plerocercoids of Diphylobothrium dentriticum (Cestoda), Exper. Cell Res., 1968, 50, 1 - 8
- 73 - HALLIDAY (S.L.), SLOBODA (A.), WILL (L.W.) et OLESON (J.J.)
- 6 aminonicotinamide and related niacin antagonists. Federation Proc., 1957, 16, 190 - 191
- 74 - HARRIS (P.J.)
- Some structural and functional aspects of the mitotic apparatus in sea urchin embryos - J. Cell Biol., 1962, 14, 475 - 487
- 75 - HARRIS (P.J.) et BAJER (A.)
- Fine structure studies on mitosis in endosperm metaphase of Haemanthus Katherinae Back. Chromosoma, 1965, 16, 624 - 636
- 76 - HARTMANN (J.F.) et ZIMMERMAN (A.M.)
- The isolated mitotic apparatus. Studies on nucleoproteins. Exper. Cell Res., 1968, 50, 403 - 417
- 77 - HUGGINS (C.), TAPLEY (D.F.) et JENSEN (E.W.)
- Sulphydryl - disulphide relationships in the induction of gels in protein by urea. Nature, 1951, 167, 592 - 593

- 78 - HYDE (B.B.) et PALIWAL (R.L.)
Sulphydryls in plant chromosomes. Proc. Intern. Cong. Genet., 1958, 2, 130
Montreal.
- 79 - INOUE (S.)
Motility of cilia and the mechanism of mitosis. Rev. Mod. Phys., 1959, 31
402 - 408
- 80 - INOUE (S.) et BAJER (A.)
Birefringence in endosperm mitosis. Chromosoma, 1961, 12, 48 - 63
- 81 - INOUE (S.) et SATO (H.)
Cell motility by labile association of molecules : The nature of mitotic spindle
fibers and their role in chromosome movements. J. Gen. Physiol., 1967, 50
259 - 292.
- 82 - JENSEN (E.V.)
Sulphydryl-disulfide interchange : this biological chain reaction explains
aspects of protein denaturation, blood clotting and mitosis. Science, 1959,
130, 1319
- 83 - JOHNSON (W.J.) HOCHSTER (R.M.) et QUASTEL (J.H.) eds.)
Dinucleotid Analogues and related substances, in "Metabolic inhibitors".
Academic Press, New York, 1963, Vol. II, 1 - 21
- 84 - JOHNSON (W.J.) et Mc COLL (J.D.)
6 aminonicotinamide : a potent nicotinamide antagonist.
Science, 1955, 122, 834
- 85 - JOHNSON (W.J.) et Mc COLL (J.D.)
Antimetabolite activity of 6 aminonicotinamide.
Federation Proc., 1956, 15, 284
- 86 - KANE (R.E.)
The mitotic apparatus isolation by controlled pH. J. Cell Biol., 1962, 12
47 - 55

87 - KANE (R. E.)

The mitotic apparatus. Identification of the major soluble component of the glycol -isolated mitotic apparatus. J. Cell Biol., 1967, 32, 243 - 254

88 - KAPLAN (N. O.) et CIOTTI (M. M.)

Chemistry and properties of the 3-acetylpyridine analogue of diphosphopyridine nucleotide. J. Biol. Chem., 1956, 221, 823 - 832

89 - KAPLAN (N. O.), CIOTTI (M. M.) et STOLZENBACH (F. E.)

Reaction of pyridine nucleotide analogues with dehydrogenases. J. Biol. Chem., 1956, 221, 833 - 844

90 - KAPLAN (N. O.), CIOTTI (M. M.), VAN EYS (J.) et BURTON (R. M.)

Effect of pyridine derivatives on animal tissue diphosphopyridine nucleotidases. J. Biol. Chem., 1959, 234, 134 - 138

91 - KAPLAN (N. O.), GOLDIN (A.), HUMPHREYS (S. R.), CIOTTI (M. M.) et VENDITTI (J. M.)

Significance of enzymatically catalyzed exchange reactions in chemotherapy. Science, 1954, 120, 437 - 440

92 - KAPLAN (N. O.), GOLDIN (A.), HUMPHREYS (S. R.) et STOLZENBACH (F. E.)

Pyridine precursors of mouse liver diphosphopyridine nucleotide. J. Biol. Chem., 1957, 226, 365 - 371

93 - KAWAMURA (N.) et DAN (K.)

A cytochemical studies of the sulfhydryl groups of sea urchin eggs during the first cleavage. J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, 4, 615 - 620

94 - KIEFER (B.), SAKAI (H.), SOLARI (A. J.) et MAZAI (D.)

The molecular unit of the microtubules of the mitotic apparatus. J. Mol. Biol., 1966, 20, 75 - 79

- 95 - KLIMEL (M.)
Toxicity of N - ethylmaleimide and Di-~~t~~-butyl nitroxide radiosensitizers towards Hela S₃ cells in a single cell culture.
Nature, 1966, 209, 1256 - 1257
- 96 - KOSTOFF (D.)
A typical growth, abnormal mitosis and polyploidy induced by ethylmercury chloride. Phytopathol. Z., 1940, 23, 90 - 96
- 97 - LALLIER (R.)
Les effets du thiosorbitol et du thioglycérol sur la structure de l'appareil mitotique de l'oeuf de l'oursin Paracentrotus lividus.
J. Cell Biol., 1962, 15, 382 - 384
- 98 - LAMBE (R. F.) et WILLIAMS (D. C.)
The enzymic reduction of nicotinamide adenine dinucleotide by 2 mercapto-ethanol. Biochem. J., 1965, 97, 475 - 478
- 99 - LANDAUER (W.)
Niacin antagonists and chick development. J. Exptl. Zool., 1957, 136, 509 - 530
- 100 - LEDBETTER (M. C.)
The disposition of microtubules in plant cells during interphase and mitosis in "Formation and fate of cell organelles".
Symp. Internation. Soc. Cell. Biol (WARREN (K. B.) eds) Academic Press, New York, 1967, 55 - 70
- 101 - LEDBETTER (M. C.) et PORTER (K. R.)
A "microtubule" in plant cell fine structure. J. Cell Biol., 1963, 19, 239 - 250
- 102 - LEE (S. H. S.), DOBSON (P. R.) et VAN ROOYEN (C. E.)
Antiviral substances : 6 aminonicotinamide and 1 - adamantanamine hydrochloride - Chemotherapy, 1966, 11, 163 - 177
- 103 - LEVAN (A.)
Cytological reactions induced by inorganic salt solutions.
Nature, 1945, 156, 751

- 104 - LIMA de FARIA (A.)
- Recent advances in the study of the kinetochore. Internat. Rev. Cytol., 1958
7, 123 - 157
- 105 - LIMBOSCH-ROLIN (S.)
- Les effets du β mercaptoéthanol et du dithiodiglycol sur la croissance d'E. Coli
et de Saccharomyces cerevisiae. Exper. Cell. Res., 1963, 29, 61 - 72
- 106 - LIMBOSCH-ROLIN (S.)
- Etude comparative des effets de différents agents sur la division de cellules
cancéreuses et normales.
Arch. Biol. Belg., 1963, 74, 63 - 77
- 107 - LIMBOSCH-ROLIN (S.) et BRACHET (J.)
- Etude des effets du mercaptoéthanol et du dithiodiglycol sur la division
cellulaire chez les oeufs d'Amphibiens.
Exper. Cell Res., 1961, 24, 120 - 130
- 108 - LONGEVIALLE (M.)
- Effet mitoclasique et chromatoclasique du β mercaptoéthanol sur les cellules
méristématiques des racines d'Allium Sativum. C.R. Acad. Sci., 1968,
267, 708 - 711
- 109 - LUKETIC (G. C.), SANTINI (R.) et BUTTERWORTH (C. E.)
- Depression of whole blood folate activity by colchicine.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1965, 120, 13 - 16
- 110 - LYNCH (J. P.) et HOWARD-FLANDERS (P.)
- Effect of pretreatment with nitric oxid and N - ethylmaleimide on the level
of sulphhydryl compounds in bacteria and on their sensitivity to X - irradi-
tion under anoxia. Nature, 1962, 194, 1247 - 1249
- 111 - Mac ALLISTER (H. C.) et SCHWEET (R. S.)
- Involvement of sulphhydryl groups in the binding of t-RNA to reticulocytes
ribosomes - J. Mol. Biol., 1968, 34, 519 - 525

- 112 - Mac FARLANE (E. W. E.)
Somatic mutations produced by organic mercurials in flowering plants.
Genetic, 1950, 35, 122 - 123
- 113 - Mac FARLANE (E. W. E.)
Cytological conditions in root tip meristem after gross antagonism of phenyl-mercuric poisoning. Exper. Cell Res., 1953, 5, 375 - 385
- 114 - Mac FARLANE (E. W. E.) et NADEAU (L. V.)
Antagonism by cellular extracts of effects of respiratory poisons on onion roots and sea urchin eggs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1948, 67, 118 - 121
- 115 - Mac FARLANE (E. W. E.), MESSING (A. M.) et RYAN (M. H.)
Effects of water source on toxicity of mercurial poisons. I. Standardization of procedure in test using *Allium* roots.
J. Heredity, 1951, 42, 95 - 99
- 116 - Mac FARLANE (E. W. E.) et SCHMOCK (N. G.)
The colchicine and colchicine-like reaction as a possible response to enzymic poison - Science, 1948, 108, 712 - 713
- 117 - MANGENOT (G.) et CARPENTIER (S.)
Le plomb et le mercure, poisons mitoclasiques.
C. R. Soc. Biol., 1945, 139, 268 - 270
- 118 - MARANTZ (R.), VENTILLA (M.) et SHELANSKI (M. L.)
Vinblastine-induced precipitation of microtubule protein.
Science, 1969, 165, 498 - 499
- 119 - MARSLAND (D.)
Cell division : Enhancement of the antimitotic effects of colchicine by low temperature and high pressure in the cleaving eggs of *Lytechinus Variegatus*.
Exper. Cell Res., 1968, 50, 369 - 376
- 120 - MARSLAND (D.) et HECHT (R.)
Cell division : antimitotics effects of colchicine and D₂ O on first cleavage in the eggs of *Arbacia punctulata*.
Exper. Cell Res., 1968, 51, 602 - 608

- 121 - MARSLAND (D.) et ZIMMERMAN (A.M.)

Cell division : differential effects of heavy water upon the mechanisms of cytokinesis and karyokinesis in the eggs of Arbacia punctulata.
Exper. Cell Res., 1963, 30, 23 - 35

- 122 - MAZIA (D.)

- SH and growth, -in "Glutathione". (S. Colowick et als. eds)
Academic Press. New York, 1955, 209 - 222

- 123 - MAZIA (D.)

The organization of the mitotic apparatus. Symp. Soc.
Exper. Biol., 1955, 9, 335 - 357

- 124 - MAZIA (D.)

SH compounds in mitosis. I. The action of mercaptoethanol on the eggs of the sand dollar Dendraster excentricus.
Exper. Cell Res., 1958, 14, 486 - 494

- 125 - MAZIA (D.)

The production of twin embryos in dendraster by means of mercaptoethanol (monoethylene glycol).
Biol. Bull., 1958, 114, 247 - 254

- 126 - MAZIA (D.)

The role of thiol groups in the structure and function of the mitotic apparatus - in "Sulfur in protein" (BENESCH R. et als. eds) Academic Press, New York, 1959, 367 - 389

- 127 - MAZIA (D.)

The central problems of the biochemistry of cell division - in "Biological structure and function" - (GOODWIN T.W. et LINDBERG O. eds)
Academic Press - New York, 1961, Vol II, 475 - 496

- 128 - MAZIA (D.)

Mitosis and the physiology of cell division - in "The Cell". (Brachet J. et Mirsky A.E. eds)
Academic Press, New York, 1961, Vol III, 78 - 412

- 129 - MAZIA (D.)
- Fibrillar structure in the mitotic apparatus - in "Formation and Fate of cell organelles". Symp. Intern. Soc. Cell Biol. (WARREN K.B. eds) Academic Press, New York, 1967, 39 - 54
- 130 - MAZIA (D.) et DAN (K.)
- The isolation and biochemical characterization of the mitotic apparatus of dividing cells - Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash) 1952, 28, 826 - 838
- 131 - MAZIA (D.), HARRIS (P.J.) et BIBRING (T.)
- The multiplicity of the mitotic centers and the time course of their duplication and separation.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1960, 7, 1 - 20
- 132 - MAZIA (D.), MITCHISON (J.M.), MEDINA (H.) et HARRIS (P.J.)
- The direct isolation of the mitotic apparatus
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 10, 467 - 474
- 133 - MAZIA (D.) et ZEUTHEN (E.)
- Blockage and delay of cell division in synchronized populations of Tetrahymena by mercaptoethanol (monoethylene glycol)
C.R. Trav. Lab. Carlsberg, 1966, 35, 341 - 361
- 134 - MEEKER (G.L.)
- The effect of B mercaptoethanol on synchronously dividing populations of Astasia longa.
Exper. Cell Res., 1964, 35, 1 - 8
- 135 - MIKI - NOUMURA (T.)
- Isolation of fine filaments from the mitotic apparatus of sea urchin eggs
Embryologia (Nagoya), 1965, 9, 98 - 103
- 136 - MIKI - NOUMURA (T.)
- Purification of the mitotic apparatus protein of sea urchin eggs.
Exper. Cell Res., 1968, 50, 54 - 64

137 - MOLE - BAJER (J.)

Cinemicrographic analysis of C - mitosis in endosperm.
Chromosoma, 1958, 9, 332 - 358

138 - MOLE - BAJER (J.)

Fine structural studies of apolar mitosis
Chromosoma, 1969, 26, 427 - 448

139 - MYREN (J.), CEBALLOS (R.) et LUKETIC (G.C.)

Colchicine effects on the mouse liver. Scand. J. Gastroent., 1967, 2,
7 - 17.

140 - NEWCOMB (E.H.)

Plant microtubules. Ann. Rev. Plant Physiol., 1969, 20, 253 - 288

141 - NICKERSON (W.J.) et FALCONE (G.)

Function of protein disulfide reductase in cellular division of yeasts - in
"Sulfur in proteins" (BENESCH R. et al., eds)
Academic Press, New York, 1959, 409 - 424

142 - OLCOTT (H.S.)

Monothioglycol
Science, 1942, 96, 454

143 - PICKETT - HEAPS (J.D.)

The effects of colchicine on the ultrastructure of dividing plant cells xylem
wall differentiation and distribution of cytoplasmic microtubules.
Develop. Biol., 1967, 15, 206 - 236

144 - PICKETT - HEAPS (J.D.) et NORTHCOTE (D.H.)

Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis
and cytokinesis in wheat meristems.
J. Cell Sci., 1966, 1, 109 - 120

- 145 - POCHON - MASSON (J.)
Structures et fonctions des ultrastructures cellulaires dénommées
"microtubules".
Ann. Biol., T. VI, Fasc 7 - 8, 1967
- 146 - POHL (V.) et QUERTIER (J.)
Groupes sulfhydryles et morphogénèses. IV. Effets du β mercaptoéthanol
et de l'acide α lipoïque sur le métabolisme des acides nucléiques chez les
embryons de Batracien et de Poulet.
J. embryol. and exper. Morphol., 1963, 11, 293 - 305
- 147 - PORTER (K.R.)
Changes in cell fine structure accompanying mitosis - in "Fine structure
of cell". Symp. 8th Congress of cell Biol. Interscience, New York,
1955, 236 - 250
- 148 - PORTER (K.R.)
Cytoplasmic microtubules and their function -in "Principles of Biomolecular
Organization". (Wolstenholme (G.E.W.) et O'Connor (M.) eds)
Churchill - London, 1966, 308 - 356
- 149 - PULLMAN (B.) et PULLMAN (A.)
On the 6 aminonicotinamide antagonism of DPN-dependent enzymatic
systems.
Cancer Res., 1959, 19, 337 - 338
- 150 - RAMEL (C.)
Genetic effects of organic mercury empounds - 1 - Cytological investigations
on Allium roots.
Hereditas, 1969, 61, 208 - 230
- 151 - RAPKINE (L.)
Sur les processus chimiques au cours de la division cellulaire.
Ann. Physiol. Physicochim. Biol., 1931, 7, 382 - 418
- 152 - REBHUN (L.I.) et SANDER (G.)
Ultrastructure and birefringence of the isolated mitotic apparatus of marine
eggs.
J. Cell Biol., 1967, 34, 859 - 883

- 153 - RENAUD (I. L.), ROWE (A. J.) et GIBBONS (I. R.)
Some properties of the protein forming the outer fibers of cilia
J. Cell Biol., 1968, 36, 79 - 90
- 154 - ROBBINS (E.) et GONATAS (N. K.)
Histochemical and ultrastructural studies on HeLa cell culture exposed to spindle inhibitors with special reference to the interphase cell.
J. Histochem. Cytochem., 1964, 12, 704 - 711
- 155 - ROELS (M. P.), FAUTREZ-FIRLEFYN (N.) et FAUTREZ (J.)
Etude biochimique de l'effet du β me rcaptoéthanol sur la teneur en acide ribonucléique de l'oeuf d'Artemia Salina.
Exper. Cell Res., 1964, 35, 248 - 254
- 156 - ROSENBAUM (J. L.) et CARLSON (K.)
Cilia regeneration in Tetrahymena and its inhibition by colchicine.
J. Cell Biol., 1969, 40, 415 - 425
- 157 - ROSENBAUM (J. L.), MOULDER (J. E.) et RINGO (D. L.)
Flagellar elongation and shortening in Chlamydomonas - The use of cycloheximide and colchicine to study the synthesis and assembly of flagellar proteins.
J. Cell Biol., 1969, 41, 600 - 619
- 158 - ROSS (W. C. J.)
Some 6 - substituted nicotinamides : synthesis and antineoplastic activities.
Biochem. Pharmacol., 1967, 16, 675 - 680
- 159 - ROTH (L. E.)
Electron microscopy of mitosis in amoeba. III. Cold and urea treatments : a basis for tests of direct effects of mitotic inhibitors on microtubule formation.
J. Cell Biol., 1967, 34, 47 - 59
- 160 - RYBAK (B.)
Recherches sur la constitution du fuseau achromatique - I -
Etudes chimiques de quelques modèles protéiques.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1950, 32, 703 - 718



- 161 - SAKAI (H.)
Studies on sulfhydryl groups during cell division of sea urchin eggs. VIII.
Some properties of mitotic apparatus proteins.
Biochim. Biophys. Acta, 1966, 112, 132 - 145
- 162 - SAKAI (H.)
Contractile properties of protein threads from sea urchin eggs in relation
to cell division.
Intern. Rev. Cytol., 1968, 23, 89 - 112
- 163 - SAKAI (H.) et DAN (K.)
Studies on sulfhydryl groups during cell division of sea urchin eggs.
Exper. Cell Res., 1959, 16, 24 - 41
- 164 - SASS (J. E.)
Histological and cytological studies of ethylmercury phosphate poisoning
in corn seedlings.
Phytopathology, 1937, 27, 95 - 99
- 165 - SAUAIA (H.) et MAZIA (D.)
Action of colchicine on the mitotic apparatus.
Pathol. Biol. Semaine Hop., 1961, 9, 473 - 476
- 166 - SAWADA (N.) et REBHUN (L. I.)
The effect of dinitrophenol and other phosphorylation uncouplers on the
birefringence of the mitotic apparatus of marine eggs.
Exper. Cell Res., 1969, 55, 33 - 38
- 167 - SCHINDLER (R.)
Structure activity relationships in a series of colchicine analogs.
J. Pharmacol. exper. Therapeut., 1965, 149, 409 - 416
- 168 - SCHRAM (A.) et BRACHET (J.)
Differential effects of β mercaptoethanol and reduced glutathione on protein
synthesis in a partially purified system.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 57, 596 - 598

- 169 - SEGALA (G.) et di PIETRANTONY (E.)
Ossidazione dei sulfidrilici nell'interazione "N - metildesacetil colchicina - tioli" in vitro.
Boll. Soc. ital. Farm. osp., 1969, 15, 4 - 7
- 170 - SHAPIRO (D.M.), DIETRICH (L.S.) et SHILS (M.)
Quantitative biochemical differences between tumor and host as a basis for cancer chemotherapy. V. Niacin and aminonicotinamide.
Cancer Res., 1957, 17, 600 - 604
- 171 - SHELANSKI (M.L.) et TAYLOR (E.W.)
Isolation of a protein subunit from microtubules
J. Cell Biol., 1967, 34, 549 - 554
- 172 - SHELANSKI (M.L.) et TAYLOR (E.W.)
Properties of the protein subunit of central pair and outer doublet microtubules of sea urchin flagella.
J. Cell Biol., 1968, 38, 304 - 315
- 173 - SHIMAMURA (T.), OTA (T.) et HISHIDA (R.)
Cytochemical studies on the mitotic spindle.
Symposia Soc. Cellular Chem. (Tokyo), 1957, 16, 24 - 41
- 174 - SLAUTTERBACK (D.B.)
Cytoplasmic microtubules. I. Hydra
J. Cell Biol., 1963, 18, 367 - 388
- 175 - SMYTH (D.G.), BLUMENFELD (O.O.) et KONISGBERG (W.)
Reactions of N - ethylmaleimide with peptides and amino-acids.
Biochem J., 1964, 91, 589 - 595
- 176 - SMYTH (D.G.), NAGAMATSU (A.) et FRUTON (J.S.)
Some reactions of N - ethylmaleimide .
J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 4600 - 4604



- 177 - SRINIVASAN (P.R.), BRUNFAUT (M.) et ERRERA (M.)
The role of sulphhydryl groups in RNA metabolism.
Exper. Cell Res., 1964, 34, 61 - 70
- 178 - STEPHENS (R.E.)
The mitotic apparatus : Physical chemical characterization of the 22 S protein component and its subunits.
J. Cell Biol., 1967, 32, 255 - 275
- 179 - STERN (H.)
Multiple functions of Sulfur in mitosis - in "Sulfur in proteins".
(BENESCH R. et als. eds)
Academic Press, New York, 1959, 391 - 408
- 180 - STERN (H.)
Biochemical sequences in mitosis - in "Developing cell systems and their control" (RUDNICK ed.)
Ronald Press Company, New York, 1960, 135 - 165
- 181 - STREICHENBERGER (G.), BOISMARE (F.), GUY (J.) et LECHAT (P.)
Essai de différenciation entre synergie additive et potentialisatrice dans le cas d'associations d'hypnotiques.
Thérapie, 1968, 23, 175 - 189
- 182 - STUBBLEFIELD (E.) et BRINKLEY (B.R.)
Architecture and function of the mammalian centriole - in "Formation and Fate of cell Organelles". Symp. Intern. Soc. Cell Biol., (WARREN K.B. ed)
Academic Press, New York, 1967, vol 6, 175 - 218
- 183 - TAMAOKI (T.) et MIYAZAWA (F.)
Dissociation of Escherichia Coli ribosomes by sulphhydryl reagents
J. Mol. Biol., 1967, 23, 35 - 46
- 184 - THEORELL (H.) et BONNICHSEN (R.K.)
The mechanism of alsohol deshydrogenase action -
Acta Chim. Scand., 1951, 5, 329

- 185 - THOMPSON (J. F.), BLACK (S.) et HUDSON (B.)
A new glutathione disulfide transhydrogenase. Federation Proc. , 1960, 19, 33
- 186 - THOMPSON (E. O. P.) et O'DONNELL (J.)
Quantitative reduction of disulphide bonds in proteins using high concentrations of mercaptoethanol.
Biochim. Biophys. Acta., 1961, 53, 447 - 449
- 187 - TILNEY (L. G.) et GIBBINS (J. R.)
Differential effects of antimetabolic agents on the stability and behavior of cytoplasmic and ciliary microtubules. Protoplasma, 1968, 65, 167 - 179
- 188 - VAN EYS (J.), KAPLAN (N. O.) et STOLZENBACH (F. E.)
Reaction of thiol compounds with pyridine nucleotides -
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 23, 221 - 222
- 189 - VAN OVERBEEK (J.), BLONDEAU (R.) et HORNE (V.)
Maleimides as auxin antagonists. AM. J. Botany, 1955, 42, 205 - 213
- 190 - WALKER (I. G.)
Protection of animal cells against mustard gas by pretreatment with dithiothreitol. Proc. 5th Intern. Congress. Chemotherapy. Vienne, 1967, 1063
- 191 - WALKER (I. G.) et SMITH (J. F.)
Protection of L. cells by thiols against the toxicity of sulfur mustard.
Canad. J. Physiol. Pharmacol., 1969, 47, 143 - 151
- 192 - WARREN (R. H.)
The effect of colchicine on myogenesis in vivo in Rana pipiens and Rhodnius prolixus (Hemiptera)
J. Cell Biol., 1968, 39, 544 - 555



193 - WEBB (J.L.)

N - ethylmaleimid-in "Enzyme and metabolic inhibitors".
Academic Press, New York, 1966, Vol III, 337 - 365

194 - WEISSBACH (A.)

A novel system for the incorporation of aminoacids by extracts of E. Coli B
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 41, 498 - 509

195 - WEITZEL (G.) et BUDDECKE (E.)

Vergleich der Einwirkung von Zink, Per-Sauerstoff und Alkylierungsmitteln
auf Hefezellen.
Z. Physiol. Chem., 1959, 317, 150 - 173

196 - WENT (H.A.)

Structural modifications of the mitotic apparatus during the early cleavages
in sand Dollar eggs - Chromosoma, 1962, 13, 219 - 242

197 - WENT (H.A.)

The behavior of centrioles and the structure and formation of the achromatic
figure. Protoplasmatologia, 1966, 6, 53 - 99

198 - WILSON (L.) et FRIEDKIN (M.)

The biochemical events of mitosis. II. The in vivo and in vitro binding of
colchicine in Grasshoper embryos and its possible relation to inhibition of
mitosis.
Biochem., 1967, 6, 3126 - 3135

199 - WISHNIEWSKI (H.), SHELANSKI (M.L.) et TERRY (R.D.)

Effects of mitotic spindle inhibitors on neurotubules and neurofilaments in
anterior horn cells. J. Cell Biol., 1968, 38, 224 - 229

200 - WOODS (M.) et BURK (D.)

Formation of glycolytic inhibitor from 6 aminonicotinamide by ascites tumor
cells in vivo and in vitro and metabolic requirements for formation of this
inhibitor. Biochem. Z., 1963, 338, 381 - 392



201 - ZIMMERMAN (A. M.)

Physicochemical analysis of the isolated mitotic apparatus.
Exper. Cell Res., 1960, 20, 529 - 547

202 - ZIMMERMAN (A.) et MARSLAND (D.)

Cell division effects of pressure on the mitotic mechanisms of marine eggs
(Arbacia punctulata).

Exper. Cell Res., 1964, 35, 293 - 302

203 - ZIMMERMAN (A. M.) et SILBERMAN (L.)

Cell division : the effect of hydrostatic pressure of the cleavage schedule
in Arbacia punctulata.

Exper. Cell Res., 1965, 38, 454 - 464

-:-



TABLE DES MATIERES

Page

INTRODUCTION

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LE FUSEAU

1

I - Morphologie

1

A : Le fuseau en microscopie photonique

1

B : Le fuseau en microscopie électronique

2

I - La notion des microtubules - Structure fine et distribution

2

2 - Origine des microtubules fusoriaux

3

3 - Comportement des microtubules au cours de la mitose

3

II - Physicochimie

4

A : Les techniques d'isolement de l'appareil mitotique

4

B : Résolution des microtubules en unités et subunités

5

C : Immunochimie du fuseau

8

D : Relation entre la structure fine et les sous-unités protéiques

8

E : Cristallisation de la protéine microtubulaire

9

III - Biochimie : les protéines sulphydrylées

9

A : Les thiols cellulaires

9

B : Les thiols protéiques solubles

10

C : Les thiols protéiques insolubles

12

D : Le "paradoxe" des thiols

13



IV - <u>Labilité : action de la colchicine</u>	14
A : Effet cytologique de la colchicine	15
B : Etudes biochimiques sur l'action de la colchicine	16
 <u>RESULTATS EXPERIMENTAUX</u>	 20
I - <u>Matériel et technique</u>	20
A : Le test "Allium"	20
B : Variantes du test "Allium"	22
C : La mitose normale et ses modifications	24
D : Numération des mitoses	26
 II - <u>Résultat</u>	 29
A : <u>Les inhibiteurs des groupements - SH</u>	29
I - Action cytologique du N - éthylmaléimide	29
. Association colchicine - N - éthylmaléimide	34
2 - Action cytologique de l'hydroxyde de phénylmercure	36
. Association colchicine-hydroxyde de phénylmercure	49
 B : <u>Les composés sulfhydrylés</u>	 51
I - Action cytologique du mercaptoéthanol	51
. Antagonisme colchicine-mercaptoéthanol	63
2 - Action cytologique du dithioérythritol	68
. Antagonisme colchicine-dithioérythritol	78

C : <u>Les composés à liaison disulfure</u>	79
I - Action cytologique du dithiodiglycol	79
. Antagonisme colchicine-dithiodiglycol	91
. Association mercaptoéthanol-dithiodiglycol	93
2 - Action cytologique du chlorhydrate de cystamine	98
. Antagonisme colchicine-chlorhydrate de cystamine	
D : <u>Les antivitamines</u>	99
I - Action cytologique du 6 aminonicotinamide	99
. Association colchicine - 6 aminonicotinamide	108
2 - Action cytologique de l'acétylpyridine	113
. Association colchicine - acétylpyridine	120
3 - Action cytologique de la galactoflavine	121
. Association galactoflavine - 6 aminonicotinamide	
. Association colchicine - galactoflavine - 6 aminonicotinamide	
<u>DISCUSSION</u>	122
I - <u>Conséquences de la rupture de l'équilibre thiol-disulfure</u>	122
A : <u>En traitement continu</u>	122
I - Comparaison des activités mitodépressives	123
2 - Comparaison des activités toxiques	124
3 - Comparaison des activités mitoclasiques	125

B : <u>En traitement discontinu</u>	128
C : <u>Comparaison des inhibiteurs des groupements thiols</u>	128
D : <u>Comparaison des dérivés sulfurés</u>	131
E : <u>Comparaison des antivitamines</u>	134
2 - <u>Rapports de la colchicine avec la réaction d'oxydoréduction thiol-disulfure</u>	135
A : Antagonisme et synergie	135
B : Influence des inhibiteurs des groupements thiols sur l'activité mitoclasique de la colchicine	139
C : Influence des dérivés sulfurés sur l'activité mitoclasique de la colchicine	141
D : Influence des antivitamines sur l'activité mitoclasique de la colchicine	142
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	146
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	

125	B : En traitement diazotique
128	C : Comparaison des inhibiteurs des groupements thioles
131	D : Comparaison des dérivés sulfhydryls
134	E : Comparaison des antioxydants

135	2 - Rapports de la colchicine avec la réaction d'oxydation thiol-disulfure
-----	---

138	A : Antagonisme et synergisme
139	B : Influence des inhibiteurs des groupements thioles sur l'activité mitochondriale de la colchicine
141	C : Influence des dérivés sulfhydryls sur l'activité mitochondriale de la colchicine
142	D : Influence des antioxydants sur l'activité mitochondriale de la colchicine

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

BIBLIOGRAPHIE

